

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Laura RUPNIK

**UPORABA Z GLIVAMI RAZKROJENEGA LESA ZA  
BIOFILTRACIJO VODE ONESNAŽENE Z  
BAKROVIMI SPOJINAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

## **POPRAVKI**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Laura RUPNIK

**UPORABA Z GLIVAMI RAZKROJENEGA LESA ZA  
BIOFILTRACIJO VODE ONESNAŽENE Z BAKROVIMI  
SPOJINAMI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**USE OF WOOD DECAYED BY FUNGI FOR BIOFILTRATION OF  
COPPER COMPOUNDS POLUTED WATER**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija lesarstva. Opravljeno je bilo v laboratorijih Delovne skupine za patologijo in zaščito lesa na Oddelku za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja določil prof. dr. Miho Humarja, za recenzenta pa prof. dr. Franca Pohlevna.

Mentor: prof. dr. Miha Humar

Recenzent: prof. dr. Franc Pohleven

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Laura RUPNIK

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 630*841.2
KG	les/glive/biofiltracija/bakrove spojine
AV	RUPNIK, Laura
SA	HUMAR, Miha (mentor)/POHLEVEN, Franc (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI	2010
IN	UPORABA Z GLIVAMI RAZKROJENEGA LESA ZA BIOFILTRACIJO VODE ONESNAŽENE Z BAKROVIMI SPOJINAMI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 63 str., 18 pregl., 51 sl., 103 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Težke kovine, kot so na primer bakrove in kositrove spojine, ki zaidejo v vodni sistem, so strupene za vodne organizme ter zmanjšajo učinkovitost bioloških čistilnih naprav. Raziskali smo možnost, da bi kot biofilter ali absorbent uporabili z glivami preraščen les. S presejalnim testom smo na hranilnem gojišču določali vpliv kositrovih spojin na rast pisane ploskocevke (<i>Trametes versicolor</i>), ogljene kroglice (<i>Hypoxyylon fragiforme</i>), bukovega ostrigarja (<i>Pleurotus ostreatus</i>), bele hišne gobe (<i>Antrodia vaillantii</i>) ter navadne tramovke (<i>Gloeophyllum trabeum</i>). Zaradi visoke fungicidnosti in nedostopnosti analiznih tehnik smo nadaljnji test biofiltracije opravili le z bakrovimi raztopinami. Tako smo določili vpliv glivnega razkroja na absorpcijo bakrovih učinkovin na delno razkrojeni les, ter osvetlili vpliv časa namakanja in koncentracije bakrovih učinkovin na absorpcijo le-teh v okuženo in neokuženo lesno maso. Za substrat smo uporabili mešanico bukovega in smrekovega lesa ter pšeničnih otrobov ter ga inokulirali z ogljeno kroglico in belo hišno gobo; uporabili pa smo tudi plesniv substrat. Substrat smo prelimi z vodnimi raztopinami z različnimi koncentracijami bakra (0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm in 100 ppm) ter ga pustili namakati različno dolgo (5 min, 15 min in 45 min ter 7 dni in 14 dni). Pri 7 dnevnem in 14 dnevnem namakanju smo izvedli preizkus še s posušenim substratom. Količino absorbiranega bakra v substratu ter preostanek bakra v vodi smo nato izmerili z rentgensko fluorescenčno analizo (XRF). Ugotovili smo, da je kontrolni substrat absorbiral največ bakrovih učinkovin. Presenetil pa je plesniv substrat, ki se je po daljšem namakanju izkazal kot najbolj učinkovit. Najslabše se je odrezal z belo hišno gobo preraščeni substrat.</p>

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 630\*841.2  
CX wood/fungi/biofiltration/copper based compounds  
AU RUPNIK, Laura  
AA HUMAR, Miha (supervisor)/POHLEVEN, Franc (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science  
and Technology  
PY 2010  
TI USE OF WOOD DECAYED BY FUNGI FOR BIOFILTRATION OF COPPER  
COMPOUNDS POLUTED WATER  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 63 p., 18 tab., 51 fig., 103 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Heavy metals, like copper and tin compounds emitted into water system, are toxic to aquatic organisms and often reduce the efficiency of wastewater treatment plants. Application possibility of fungi infested wood used as a biofilter was researched. By screening test of the nutrient media the effect of tin compounds on the growth of *Trametes versicolor*, *Hypoxylon fragiforme*, *Pleurotus ostreatus*, *Antrodia vaillantii* and *Gloeophyllum trabeum* was determined. Due to the unavailability of analytical techniques and high fungicidal efficacy, further biofiltration studies were performed with copper solution only. The impact of fungal infestation on the absorption of copper in degraded wood was elucidated. Furthermore, influence of soaking time and copper concentrations on the absorption of these substances in colonized and non-colonized wood substrates was determined as well. As substrate the mixture of beech and spruce wood, wheat bran, inoculated with *Hypoxylon fragiforme*, *Antrodia vaillantii* and mould. Substrate, was poured in water solutions with various concentrations of copper (0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm and 100 ppm), and let to soak for different periods (5 min, 15 min and 45 min, 7 days and 14 days). 7 day- and 14 day lasting experiments were carried out with dried substrate as well. The amount of absorbed copper in the substrate and the remained Cu in the water was measured by X-ray fluorescence analysis (XRF). The results showed that the control substrate absorbed more copper than infested ones. However, moldy substrate after prolonged soaking proved to be most effective. The least effective was substrate colonized by *Antrodia vaillantii*.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OBRAZLOŽITEV PROBLEMA .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
1.3 CILJ DIPLOMSKE NALOGE.....	1
<b>2 PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>2</b>
2.1 OKOLJEVARSTVENI TRENDI NA PODROČJU LESARSTVA .....	2
2.2 LESNE GLIVE IN NJIHOVA UPORABA V BIOTEHNOLOGIJI .....	4
2.2.1 Biotehnoški postopki obdelave lesa.....	4
2.2.2 Biotehnoški postopki zašite lesa .....	5
2.2.3 Bioremediacija odsluženega zaščitenega lesa.....	6
2.2.4 Biotehnoški postopki predelave lesa .....	7
2.3. VPLIV KOVIN NA GLIVE.....	9
2.3.1 Bistvene in nebistvene kovine za rast gliv .....	9
2.3.2 Odpornost in tolerantnost gliv na kovine.....	10
2.4 LASTNOSTI BAKRA IN KOSITRA .....	10
2.4.1 Baker.....	10
2.4.1.1 Delovanje bakra.....	11
2.4.1.2 Izpiranje bakra iz lesa .....	12
2.4.1.3 Toleranca gliv na baker .....	12
2.4.2 Kositer .....	14
2.5 BIOFILTRACIJA .....	15
2.5.1 Opis tehnološkega postopka biološkega čiščenja.....	15
2.6 BIOFILTRACIJA TEŽKIH KOVIN .....	17
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1 MATERIAL .....	18
3.1.1 Substrat .....	18
3.1.2 Vrste gliv.....	18
3.1.2.1 Opis gliv .....	18
3.1.2.1.1 Pisana ploskocevka ( <i>Trametes versicolor</i> ) .....	18
3.1.2.1.2 Ogljena kroglica ( <i>Hypoxylon fragiforme</i> ) .....	19
3.1.2.1.3 Bukov ostrigar ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) .....	20
3.1.2.1.4 Bela hišna goba ( <i>Antrodia vaillantii</i> ) .....	20
3.1.2.1.5 Navadna tramovka ( <i>Gloeophyllum trabeum</i> ) .....	21
3.1.2 Tehnična sredstva .....	22
3.2 METODE .....	22
3.2.1 Presejalni test .....	23

3.2.1.1	Priprava hrailnega gojišča .....	23
3.2.1.2	Priprava vodnih raztopin TBTO .....	24
3.2.1.3	Inokulacija hrailnega gojišča z izbranimi kulturami gliv .....	24
3.2.1.4	Postopek ocenjevanja rezultatov .....	25
<b>3.2.2</b>	<b>Izvedba postopka biofiltracije .....</b>	<b>25</b>
3.2.2.1	Priprava gojišča - substrata.....	25
3.2.2.2	Priprava raztopin.....	26
3.2.2.3	Izvedba biofiltracije .....	27
<b>3.2.3</b>	<b>Rentgenska fluorescenčna analiza (XRF).....</b>	<b>28</b>
3.2.3.1	Priprava vzorcev .....	30
3.2.3.2	Postopek analize XRF .....	31
<b>3.2.4</b>	<b>Merjenje pH vrednosti .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>33</b>
4.1	PRESEJALNI TEST .....	33
4.1.1	Vpliv organo kositrovih spojin na rast lesnih gliv .....	33
4.1.2	Vpliv bakrovih spojin na rast lesnih gliv.....	37
4.2	UČINKOVITOST BIOFILTRACIJE BAKROVIH PRIPRAVKOV .....	37
4.2.1	<b>Vpliv časa namakanja na učinkovitost biofiltracije .....</b>	<b>38</b>
4.2.1.1	Učinkovitost biofiltracije po petih minutah namakanja .....	38
4.2.1.2	Učinkovitost biofiltracije po petnajstih minutah namakanja.....	39
4.2.1.3	Učinkovitost biofiltracije po petinštiridesetih minutah namakanja.....	40
4.2.1.4	Učinkovitost biofiltracije po sedmih dneh namakanja .....	41
4.2.1.5	Učinkovitost biofiltracije po štirinajstih dneh namakanja.....	44
4.2.2	<b>Vpliv preraščanja substrata z glivami na uspeh biofiltracije.....</b>	<b>47</b>
4.2.2.1	Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s kontrolnim substratom ...	47
4.2.2.2	Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s substratom okuženim z glivo ogljeno kroglico.....	49
4.2.2.3	Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s substratom okuženim z glivo belo hišno gobo .....	51
4.2.2.4	Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s plesnivim substratom ....	53
4.3	SPREMLJANJE pH VREDNOSTI.....	55
<b>5</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>58</b>

## ZAHVALA

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Evropski razredi uporabe lesa po standardu SIST EN 335/1 (2006).....	3
Preglednica 2: Glice, razkrojevalke lesa, uporabljene pri eksperimentalnem delu diplomske naloge.....	18
Preglednica 3: Koncentracija kositra v hrnilnem gojišču ter merilnih bučkah in pripadajoče oznake .....	24
Preglednica 4: Vizualne ocene priraščanja micelija gliv.....	25
Preglednica 5: Koncantracije raztopin za biofiltracijo .....	27
Preglednica 6: Vizualne ocene priraščanja gliv v odvisnosti od koncentracije TBTO v hrnilnem gojišču .....	33
Preglednica 7: Povprečna koncentracija bakra v substratu po petih minutah namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	39
Preglednica 8: Povprečna koncentracija bakra v substratu po petnajstih minutah namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	40
Preglednica 9: Povprečna koncentracija bakra v substratu po petinštiridesetih minutah namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	41
Preglednica 10: Povprečna koncentracija bakra v substratu po sedmih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	42
Preglednica 11: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu po sedmih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	44
Preglednica 12: Povprečna koncentracija bakra v substratu po štirinajstih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	45
Preglednica 13: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu po štirinajstih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.....	46
Preglednica 14: Povprečna absorpcija bakra v neokužen substrat in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini .....	48
Preglednica 15: Povprečna absorpcija bakra v substrat okužen z ogljeno kroglico <i>(Hypoxylon fragiforme)</i> in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini .....	50
Preglednica 16: Povprečna absorpcija bakra v substrat okužen z belo hišno gobo <i>(Antrodia vaillantii)</i> in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini .....	52
Preglednica 17: Povprečna absorpcija bakra v plesniv substrat in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini .....	54
Preglednica 18: Vrednosti pH raztopine po biofiltraciji.....	55

## KAZALO SLIK

Slika 1: Z modrivkami obdelana borovina, dostopna pod komercialnim imenom Denim-pine (Denime pine, 2004) .....	8
Slika 2: Gojenje bukovega ostrigarja ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) na substratu iz lesne biomase (Za naravo, 2006) .....	8
Slika 3: Biološko čiščenje (COM-teh, 2008).....	15
Slika 4: Shema delovanja denitrifikacijskega biofiltra (Pipuš, 2007) .....	16
Slika 5: Shema delovanja nitrifikacijskega biofiltra (Pipuš, 2007) .....	17
Slika 6: Pisana ploskocevka ( <i>Trametes versicolor</i> ) (Discover Life, 1995).....	19
Slika 7: Ogljena kroglica ( <i>Hypoxyylon fragiforme</i> ) (Spletni albumi Picasa, 2008).....	19
Slika 8: Bukov ostrigar ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) (Mycotopia, 2006) .....	20
Slika 11: Avtoklav (levo) in Laminarij (desno).....	23
Slika 12: Hlajenje pripravljenega hranilnega gojišča.....	24
Slika 13: Inokulacija hranilnega gojišča v epruveti .....	25
Slika 14: Inokulirana gojišča in kontrola v rastni komori. ....	26
Slika 15: Gojišče preraslo z micelijem ogljene kroglice ( <i>Hypoxyylon fragiforme</i> ) po šestih tednih. ....	26
Slika 16: Namakanje substrata v različnih vodnih raztopinah bakrovega sulfata .....	27
Slika 17: Filtriranje substrata s pomočjo vakuma .....	28
Slika 18: Sušilnik v katerem smo pri 103 °C posušili substrat.....	28
Slika 19: Rentgenski fluorescenčni spektrometer (XRF) .....	29
Slika 20: Stiskalnica za izdelavo tablet za analizo XRF .....	30
Slika 21: Sestavni deli modela za izdelavo tablet in primer tableta iz lesa .....	30
Slika 22: Predhodno pripravljene čaše z raztopino pred analizo XRF.....	31
Slika 23: Notranjost spektrometra XRF .....	31
Slika 24: Programske vmesnike spektrometra XRF .....	32
Slika 25: pH meter Metrom 827 .....	32
Slika 26: Rast pisane ploskocevke ( <i>Trametes versicolor</i> ) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin .....	34
Slika 27: Rast pisane ploskocevke ( <i>Trametes versicolor</i> ) na hranilnem gojišču pri koncentraciji 100 ppm (levo) in 250 ppm kositra (desno) .....	34
Slika 28: Rast ogljene kroglice ( <i>Hypoxyylon fragiforme</i> ) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin .....	35
Slika 29: Rast bukovega ostrigarja ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin .....	35
Slika 30: Rast bele hišne gobe ( <i>Antrodia vaillantii</i> ) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin .....	36

Slika 31: Rast navadne tramovke ( <i>Gloeophyllum trabeum</i> ) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin .....	36
Slika 32: Obarvanje hranilnega gojišča pri navadni tramovki ( <i>Gloeophyllum trabeum</i> ) brez kositra (leva epruveta) in s 250 ppm kositra (desna epruveta) .....	37
Slika 33: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po petih minutah namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij .....	38
Slika 34: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po petnajstih minutah namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij .....	39
Slika 35: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po petinštiridesetih minutah namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij....	40
Slika 36: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po sedmih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij.....	42
Slika 37: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu okuženem z glivami po sedmih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij .....	43
Slika 38: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po štirinajstih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij.....	45
Slika 39: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu okuženem z glivami po štirinajstih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij.....	46
Slika 40: Povprečna absorpcija bakra v neinokuliran substrat v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije .....	47
Slika 41: Namočen neposušen kontrolni substrat (na levi) in namočen posušen kontrolni substrat (na desni) .....	48
Slika 42: Kontrolni, neokužen substrat stisnjen v tableto pripravljeno za meritev XRF ....	49
Slika 43: Povprečna absorbacija bakra v substrat inokuliran z ogljeno kroglico ( <i>Hypoxyylon fragiforme</i> ) v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije .....	49
Slika 44: Namočen neposušen (na levi) in namočen posušen (na desni) substrat okužen z ogljeno kroglico ( <i>Hypoxyylon fragiforme</i> ).....	50
Slika 45: Substrat okužen z ogljeno kroglico ( <i>Hypoxyylon fragiforme</i> ) stisnjen v tableto pripravljeno za meritev XRF .....	51
Slika 46: Povprečna absorpcija bakra v substrat inokuliran z belo hišno gobo ( <i>Antrodia vaillantii</i> ) v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije .....	51
Slika 47: Namočen neposušen (na levi) in namočen posušen (na desni) substrat okužen z belo hišno gobo ( <i>Antrodia vaillantii</i> ).....	52
Slika 48: Substrat okužen z belo hišno gobo ( <i>Antrodia vaillantii</i> ) stisnjen v tableto pripravljeno za meritev XRF .....	53
Slika 49: Povprečna absorpcija bakra v plesniv substrat v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije.....	53
Slika 50: Namočen neposušen (na levi) in namočen posušen (na desni) substrat okužen z plesnijo.....	54
Slika 51: Plesniv substrat stisnjen v tabletoto pripravljeno za meritev XRF .....	55

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Tv	Pisana ploskocevka ( <i>Trametes versicolor</i> )
Hf	Ogljena kroglica ( <i>Hypoxylon fragiforme</i> )
Plo <sub>5</sub>	Bukov ostrigar ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )
Pv <sub>2</sub>	Bela hišna goba ( <i>Antrodia vaillantii</i> )
Gt <sub>2</sub>	Navadna tramovka ( <i>Gloeophyllum trabeum</i> )
k	Kontrola
p	Plesen
PDA	krompirjev glukozni agar, hranilno gojišče
TBTO	tributilkositrov oksid ( $C_{24}H_{54}OSn_2$ )
XRF	rentgenski fluorescenčni spektrometer

## 1 UVOD

### 1.1 OBRAZLOŽITEV PROBLEMA

Družba se čedalje bolj zaveda onesnaženosti našega planeta. Problem ni samo sprotno onesnaževanja, ampak tudi podedovane posledice težke in umazane industrije naših prednikov, ki je dolga leta nenadzorovano onesnaževala naše okolje. Sedaj pa bi žeeli to napako, ki je bila posledica neznanja, ignorance in nezavedanja, popraviti. Organiziramo razne čistilne akcije, nenehno se izobražujemo ter iščemo rešitve kako zmanjšati onesnaževanje. Poznamo že več možnosti, nekatere so tudi uzakonjene. Na primer filtri za prašne delce, žveplove spojine, hlapne organske spojine..., so že obvezni za tovarne, katerih emisije so škodljivi za okolje. Še posebno pozornost posvečamo težkim kovinam. Veliko težkih kovin se je že vezalo v prst, kar škodi naravi. Dobro znano je, da nekatere drevesne vrste in glice uspešno vežejo določene težke kovine in jih s tem izločajo iz prsti. Kritična območja že pogozdujejo, izvaja pa se tudi bioremediacija z glivami.

Kljud številnim varnostnim ukrepom v industriji prihaja do namernih in ne namernih emisij onesnaževal. Okolje še posebej ogrožajo težke kovine. Težke kovine, ki zaidejo v vodni sistem so strupene tako za vodne organizme, pogosto pa zmanjšajo tudi učinkovitost bioloških čistilnih naprav. To velja še posebej za bakrove in kositrove spojine.

V diplomski nalogi smo se spopadli s problemom odpadnih industrijskih vod, ki vsebujejo težke kovine. Te težke kovine lahko uničijo kulturo organizmov v bioloških čistilnih napravah, zato jih moramo pred čistilno napravo nujno odstraniti iz tekočine. Ugotavljalci smo ali bi lahko za filtracijo onesnažene vode uporabili biofilter, ki bo vseboval glice na lesnem substratu.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo les, ki je bil razkrojen z glivami, absorbiral več težkih kovin kot kontrolni, glivam neizpostavljen les. Pričakujemo, da bo s časom in koncentracijo naraščala tudi absorpcija težkih kovin v les.

### 1.3 CILJ DIPLOMSKE NALOGE

Cilji diplomske naloge so določiti vpliv kositrovih in bakrovih spojin na rast izbranih gliv, določiti vpliv glivnega razkroja na absorpcijo bakrovih učinkovin na delno razkrojen les, ter osvetliti vpliv časa namakanja in koncentracije bakrovih učinkovin na absorpcijo le teh v okuženo in neokuženo lesno maso.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 OKOLJEVARSTVENI TRENDI NA PODROČJU LESARSTVA

Na področju zaščite lesa se je v zadnjih dvajsetih letih zgodilo več sprememb kot prej v dvestotih letih. Eden glavnih vzrokov za spremembe je okoljska ozaveščenost (Humar, 2004). Prepovedali so veliko biocidov, ki zelo ogrožajo okolje in ljudi. Področje zaščite lesa je regulirano s številnimi evropskimi smernicami in direktivami, kot je na primer direktiva o biocidih (Biocidal Products Directive) (BPD 98/8/EC). Po letu 2006 je na trgu dostopnih precej manj aktivnih učinkovin, kot jih je bilo prej, število se pa še zmanjšuje.

V svetu se velika skrb posveča tudi odsluženemu zaščitenemu lesu ter industrijskim emisijam v zrak in v vodo. Ena največjih težav, povezanih z zaščitenim lesom, je vprašanje, kaj storiti z njim po koncu uporabe. V odsluženem zaščitenem lesu je celo po 50 letih uporabe ostala večina biocidov (Humar in Pohleven, 2004). Odsluženem zaščiten les je z direktivo o sežiganju odpadkov (Incineration of Waste Directive 2000/76/EC) prepovedano prosto sežigati, saj pogosto vsebuje visoke količine težkih kovin, arzena, kloriranih ogljikovodikov in/ali polickličnih ogljikovodikov. Največ se ga odlaga na deponijah, ki pa imajo omejeno kapaciteto. Poleg tega so se EU države v direktivi o odlaganju odpadkov (Landfill Directive 1999/31/EEC) zavezale, da bodo omejile odlaganje biorazgradljivih odpadkov, še posebej lesa, kjer prihaja do anaerobnega razkroja polioz in tvorbe toplogrednega plina - metana. Ena od rešitev je tudi uporaba odpadlega zaščitenega lesa za izdelavo lesnih kompozitov, vendar je onesnaževal v odpadnem lesu višja od predpisane, saj se emisije biocidov iz lesa bistveno povečajo, če les zdrobimo ali razžagamo na manjše kose (Humar in Pohleven, 2004). Zaradi strožjih predpisov in stroškov odlaganja v industriji, iščejo možnosti kako tovrstne odpadke predelati ali jih energetsko izrabiti. V Sloveniji je trenutno poleg izvoza edina možna rešitev odlaganje odpadnega lesa na deponije. To področje ureja Pravilnik o odlaganju odpadkov (2000).

Glede na vrsto nevarnih snovi lahko emisije v vodno okolje razdelimo na dve skupini. V prvo skupino je uvrščenih 17 snovi, ki so v vodnem okolju posebej nevarne in so na t.i. seznamu I. Med te snovi se uvrščata dve težki kovini (živo srebro in kadmij ter njune spojine) in 15 kloriranih ogljikovodikov, in sicer 8 pesticidov (heksaklorocikloheksan, DDT, pentaklorofenol, aldrin, dieldrin, endrin, izodrin in heksaklorobenzen) in 7 kloriranih topil (ogljikov tetraklorid, heksaklorobutadien, triklorometan, 1,2-dikloroetan, trikloroetilen, tetrakloroetilen in triklorobenzen). Za te snovi so na ravni EU določeni enotni emisijski standardi ter standardi kakovosti za površinske vode, sedimente in žive organizme. V drugi skupini snovi (na t.i. seznam II) so uvrščene snovi, ki so same po sebi manj nevarne, vendar lahko imajo v vodnem okolju prav tako škodljive posledice odvisno od značilnosti in lokacije vodotoka, v katerega se te snovi odvajajo. Zaradi tega zanje niso določeni enotni standardi na evropski ravni, temveč mora emisijske standarde in okoljske standarde kakovosti določiti posamezna država. V to skupino se uvrščajo pravzaprav vse nevarne snovi, za katere posamezna država ugotovi, da se odvajajo v vodno okolje na njenem ozemlju iz točkovnih ali razpršenih virov in bi zato lahko povzročile onesnaženje. Med te snovi se uvrščajo predvsem številne kovine in nekovine ter njihove spojine (cink, baker, nikelj, krom, svinec, selen, arzen, antimон, molibden, kositer, titan, barij, berilij,

bor, uran, vanadij, kobalt, talij, telur, srebro), številni biocidi, fosfor in njegove anorganske spojine, cianidi, fluoridi, amonijev dušik, nitritni dušik... (Nevarne snovi, 2010).

Velik problem je tudi izpiranje bakrovih zaščitnih sredstev iz zaščitenega lesa, ki je v stiku z morsko vodo, saj je baker še posebej škodljiv za morske organizme. V želji, da bi rešili ta problem in našli zamenjavo za baker in kromove soli, poteka veliko raziskav. Bakrovi pripravki se bodo v Evropi in Severni Ameriki uporabljali, dokler ne bomo razvili okoljsko primernejših in cenovno sprejemljivejših nadomestkov. V nerazvitih državah sveta bakrovi zaščitni pripravki še dolgo ne bodo imeli ustrezne alternative. Danes se v zaščiti lesa uveljavlja kombinacija različnih materialov in postopkov. Uporabo le-teh pa pogojujejo ekonomski in okoljski zahteve. Ena od alternativ, ki se že uporablja, je zaščita lesa brez biocidov, kot je primer modifikacija lesa, žal pa ima v primerjavi s klasičnimi pripravki, ta oblika zaščite še relativno visoko ceno (Uhelj, 2006). Strošek impregnacije 1 m<sup>3</sup> lesa znaša približno 100 EUR. Poleg tega pa se spreminja tudi trg z zaščitenim lesom. Nekdaj najpomembnejši proizvodi - železniški pragovi in elektro-komunikacijski drogovci, predstavljajo sedaj manj kot 5 % celotne mase zaščitenega lesa. Največji delež zaščitenega lesa se danes uporabi v prvem in drugem razredu uporabe (preglednica 1), kjer les ogrožajo le insekti. Večina zaščitenega lesa se danes uporabi v konstrukcijske namene in izdelke, namenjene prostočasnim aktivnostim (igrala, vrtno pohištvo, pergole ...) (Connell, 2004). Les, uporabljen v te namene, ima bistveno višjo dodano vrednost, zato lahko cenovno prenesejo tudi okolju prijaznejše pripravke, ki so dražji.

Preglednica 1: Evropski razredi uporabe lesa po standardu SIST EN 335/1 (2006)

Razred uporabe	Splošne razmere na mestu uporabe	Opis vlažnosti lesa zaradi izpostavljenosti navlaževanju na mestu uporabe	Lesni škodljivci	
1	znotraj, pod streho	suh	lesni insekti	ob prisotnosti termitov, se ta razred označi z 1T
2	znotraj ali pod streho	občasno vlažen	kot zgoraj + glive	ob prisotnosti termitov, se ta razred označi z 2T
3	3.1 na prostem, nad zemljo, z ustrezno konstrukcijsko zaščito	občasno vlažen	modrivke in plesni + glive razkrojevalke	ob prisotnosti termitov, se ta razred označi s 3.1T oziroma 3.2T
	3.2 na prostem, nad zemljo, brez konstrukcijske zaščite	pogosto vlažen		
4	4.1 na prostem, v stiku s tlemi in/ali sladko vodo	pogosto ali stalno vlažen	kot zgoraj + glive mehke trohnobe	ob prisotnosti termitov, se ta razred označi s 4.1T oziroma 4.2T
	4.2 na prostem, v stiku s tlemi (ostri pogoji) in/ali sladko vodo	stalno vlažen		
5	v stalnem stiku z morsko vodo	stalno vlažen	glive razkrojevalke	A ladiskske svedrovke, lesne mokrice
			glive mehke trohnobe	B kot v A + lesne mokrice, tolerantne na kreozotno olje
			morski lesni škodljivci	C kot v B + pholade

## 2.2 LESNE GLIVE IN NJIHOVA UPORABA V BIOTEHNOLOGIJI

Biotehnologija je v zadnjih letih dosegla velik razvoj. Prekaša ga le razvoj informacijskih tehnologij. S svojimi številnimi možnostmi in visoko profitno stopnjo je biotehnologija še vedno ena najbolj perspektivnih panog. Uveljavila se je že v živilski in farmacevtski industriji. V zadnjem obdobju se je v Sloveniji razvilo tudi nekaj uspešnih biotehnoloških podjetij (Raspor, 1996). Verjamemo, da biotehnologija daje številne priložnosti tudi lesarjem, ki smo jih zaenkrat še premalo izkoristili. V tem stoletju bo veliko težav povezanih z odpadki, ki smo jih nakopičili v preteklem stoletju. Glive pa ponujajo odlično možnost, kako na eleganten in okolju prijazen način rešiti tudi to težavo (Humar in Pohleven, 2005b).

Veliko možnosti omogočajo lesne gline za obdelavo in predelavo lesa. V tem namene lahko uporabimo tako gline razkrojevalke, kot tudi gline modrivke ter plesni. Za vse je značilno, da izločajo nespecifične ekstracelularne encime, ki so v primerjavi z drugimi encimi zelo stabilni (Mai in sod., 2004). Ti encimi imajo širok spekter uporabe, tako v papirni in tekstilni industriji kot tudi v lesarstvu (Humar in Pohleven, 2005b).

### 2.2.1 Biotehnični postopki obdelave lesa

Les večine evropskih drevesnih vrst je neodporen proti lesnim škodljivcem. Zato ga moramo zaščititi po celotnem prerezu enakomerno in tako povečati njegovo odpornost. Najpomembnejša anatomska dejavnika, ki zmanjšuje impregnabilnost lesa, sta otiljenje in aspiracija pikens. Pri iglavcih pa se med sušenjem pikenske membrane še dodatno zapolnijo z ekstraktivnimi snovmi, lipidi, voski, smolami... Vse to otežuje penetracijo zaščitnih sredstev v les (Richardson, 1993).

V preteklosti so to težavo skušali rešiti s predpripravo lesa: parjenjem, vrezovanjem lesa, uporabo laserjev... (Richardson, 1993). Te metode so sicer izboljšale penetracijo biocidov v les, vendar ne zagotavljajo popolno prepojitev lesa po celotnem prerezu, poleg tega pa močno spremenijo videz površine.

Biotehnologija je ponudila več rešitev, kako izboljšati penetracijo zaščitnih sredstev v les. Ena izmed možnosti je uporaba številnih mikroorganizmov (Suolahti in Wallen, 1958). Permeabilnost hlodovine iglavcev, ki je bila nekaj mesecev izpostavljena bakterijam, je bistveno boljša. Bakterije so razgradile pektin pikenskih membran. Žal pa, zaradi dolgorajne izpostavitve in zahtevne inokulacije, obdelava z bakterijami ni nikoli zaživelva v praksi.

Poleg bakterij so tudi številne plesni in gline modrivke sposobne prerasti beljavo, ne da bi pri tem vplivale na mehanske lastnosti lesa. Najbolj učinkovite so se izkazale gline iz rodu *Trichoderma*, še posebej *T. viride* in *T. aureoviride*. Z izločanjem velike količine celulolaz, pektinaz in amilaz lahko razgradijo depozite na pikenskih membranah ozziroma pikenske membrane. Po štirih tednih izpostavitve hlodovine zelenim plesnim (*Trichoderma*) se je impregnabilnost beljave smrekovine izboljšala za 100 % do 150 %. Žal pa te gline niso povečale impregnabilnost jedrovine niti po štirih mesecih izpostavitve (Rosne in sod., 1998).

Messner in sodelavci (2002) so penetracijo zaščitnih pripravkov v les skušali izboljšati z izpostavitvijo glivam bele trohnobe, ki selektivno razkrajajo predvsem lignin (*Dichomitus squalens* in *Phanerochaete chrysosporum*). Že po dveh tednih izpostavitve se je impregnabilnost smrekovine bistveno izboljšala, mehanske lastnosti lesa pa se niso opazno poslabšale. Največjo oviro predstavlja strokovna zahtevnost postopka in dodatne investicije, kar proizvodnja izdelkov z nizko dodano vrednostjo težko prenese (Humar in Pohleven, 2005b).

### **2.2.2 Biotehnoški postopki zašite lesa**

Po poseku je hlodovina najbolj dovtetna za okužbo z glivami, še posebej z glivami modrkvami. Z uporabo biocidov lahko uspešno preprečimo razvoj modrkv na sveži hlodovini, vendar je uporaba biocidov nezaželena, še posebej v gozdu. Ideja biotehnoške zaščite lesa po poseku je, da preventivno okužimo les z antagonističnimi mikokulturami, ki ne obarvajo lesa. Ti organizmi z rastjo porabijo vsa lahko dostopna hranila, poleg tega pa izločajo še številne metabolne produkte ter mikotoksine, ki zmanjšajo verjetnost pojava trohnenja. Najpogosteje se uporablajo albino sevi gliv modrkv (*Ophiostoma sp.*), kvasovke (*Galactomyces geotrichum*) ali bakterij (Graf, 2001). Največja slabost tega načina zaščite je, da je uporaba mutiranih sevov v naravnem okolju v skladu z evropsko zakonodajo trenutno močno otežena. Drugi primer je biotehnoška zaščita hlodovine pred glivami razkrojevalkami. V tem primeru okužimo les z izolati, ki imajo močno antagonistično delovanje, pa čeprav povzročajo obarvanje. Najpogosteje se uporablajo plesni iz rodu *Trichoderma*, ki žal obarvajo les, zato se večinoma uporablajo kot biotehnoška zaščita lesa, kjer obarvanje ni moteče. Na ta način preprečimo okužbo lesa z glivami, po drugi strani pa te glive izboljšajo penetracijo zaščitnih pripravkov v les (Brown, 2002). Žal je delo z glivami iz rodu *Trichoderma* zelo zahtevno, saj spore lahko povzročajo veliko zdravstvenih težav: raka, dermatitis, infekcijo pljuč, težave z dihanjem, alergije... (Husman, 2004).

V biotehnologiji se iščejo tudi rešitve za zaščito lesnih izdelkov. Eden od problemov je gradbeni les, ki je pogosto najbolj izpostavljen okužbi s sivo hišno gobo (*Serpula lacrymans*). Humphries s sodelavci (2002) je dokazal, da nekateri izolati *Trichoderme* lahko preprečijo okužbo lesa s hišno gobo. Tudi ko je podgobje *Trichoderme* odmrlo, so v lesu še vedno ostali metaboliti, ki zavirajo okužbo z glivami razkrojevalkami. Delujejo preventivno, gobe pa ne uničijo, če je ta že prerasla les. Žal z biološkimi postopki ne moremo zagotoviti popolne zaščite lesa. Vsekakor pa zaščita z antagonističnimi organizmi podaljša življenjsko dobo lesnih izdelkov. Na trgu je pod komercialnim imenom BINABFYT že dostopna suspenzija spor in peletov hif naslednjih gliv: *T. polysporum*, *T. harzianum* in *Scytalidium sp.* Ta pripravek zaščiti les le pred glivami rjave trohnobe, ne prepreči pa razvoja pisane plosocevke (*Trametes versicolor*) (Bruce in sod., 1991).

Z drugim problemom pa se soočajo v termitskih predelih ZDA in Francije, kjer številni raziskovalci iščejo primerne antagonistične glive, ki bi uspešno zaščitile les pred napadom termitor. Najbolj obetajoči sta entomopatogeni glivi *Beauveria bassiana* in *Metarrhizium anasopliae*. Z glivami lahko okužimo celotno kolonijo naenkrat, pri čemer se pojavi problem odkritja podzemne kolonije ter dejstvo, da je na enem območju lahko več kolonij. Elegantnejša je rešitev, da postavimo pasti in okuženi osebki termitor postopno okužijo

celoten termitnjak. Glavna ovira pa je dobro razvit obrambni mehanizem termitnjaka, ki v hipu izloči inficirane osebke. Zato sporam dodajamo atraktante, ali pa v pasti nastavimo tako nizko koncentracijo spor, da je termiti na vhodu v termitnjak ne zaznajo (Le Bayon in sod., 2000).

### 2.2.3 Bioremediacija odsluženega zaščitenega lesa

Večina klasičnih zaščitnih sredstev za les je strupenih tudi po tem, ko je zaščiten les umaknjen iz uporabe. Kurjenje ali prosto odlaganje takšnega lesa ni dovoljeno, sežiganje v za to namenjenih inceneratorjih pa je relativno drago. Lesne glice in bakterije predstavljajo okolju prijazno rešitev mikoremediacije oziroma bioremediacije. Za les, zaščiten s pripravki na osnovi bakra (CCA, CCB, CCF, Cu-amin, bakrov naftenat), uporabljamo glice rjave trohnobe, za les, zaščiten z organskimi pripravki (kreozotno olje, Lindan ali PCP), pa glice bele trohnobe (Humar in Pohleven, 2003).

Bioremediacija z glivami bele trohnobe ni ne hitra in ne dovolj učinkovita, je pa temeljita in nespecifična, kar je izjemna prednost (Tavzes, 2003). Za uspešno bioremediacijo so se najbolje obnesli organizmi z nespecifičnim delovanje, kot so glice in bakterije, ki so jih izolirali iz zaščitenega lesa v uporabi. Z izpostavitvijo zaščitenega lesa tolerantnim izolatom glic dosežemo, da ti razgradijo les in biocide v lesu v okolju nenevarne produkte. Večina postopkov remediacije odpadnih železniških pragov je dvostopenjskih. Zaščiten les najprej izpostavimo bakterijam, nato pa še glivam, ki razgradijo preostale spojine (Messner in Böhmer, 1998).

Uporaba pentaklorfenola (PCP) je v večini evropskih držav že prepovedana, vendar je trajnost lesa od 30 do 50 let. Zato bo v naslednjih letih odslužen, s PCP zaščiten les, povzročil veliko težav. Glice, ki so najbolj učinkovite, so: *Trichoderma viride*, *Coniophora puteana* in *Trametes hirsuta* (Mai in sod., 2004).

Najbolj vsestranski glivi, ki lahko razkrajata zelo širok spekter biocidov, sta *Trametes versicolor* in *Pleurotus ostreatus* (Lee in sod., 1992). V laboratoriju Delovne skupine za patologijo in zaščito lesa pa se je kot izredno učinkovita izkazala tudi *Hypoxyylon fragiforme* (Pezdirc, 2005; Vidic, 2008).

Ker so anorganski biocidi nerazgradljivi, jih moramo iz lesa izpirati. Izpiranje omogočimo, če odslužen zaščiten les izpostavimo glivnim izolatom, ki so tolerantni na bakrove pripravke. Največ tolerantnih gliv pripada rodu *Antrodia*. Te glice izločajo velike količine oksalne kislinske, ki s kromom oziroma arzenom tvori dobro topne oksilate in jih po izpostavitvi izperemo iz lesa. Po drugi strani pa nastanejo tudi v vodi netopni kompleksi bakrovega oksalata. Če želimo tudi te izprati iz lesa, moramo uporabiti vodno raztopino amoniaka. Po štirih tednih izpostavitve odpadnega lesa glivam, lahko iz lesa izperemo okoli 97 % kromovih, 98 % arzenovih in 80 % bakrovih spojin (Humar in Pohleven 2005b).

## 2.2.4 Biotehnoški postopki predelave lesa

Biotehnoški postopki v lesarstvu pomenijo velik izziv. Biotehnologija je visokotehnoška panoga, ki omogoča izdelavo izdelkov z višjo dodano vrednostjo in nadomestitev številnih okoljsko spornih postopkov, s primernejšimi. Številne rešitve so še vedno uporabljene zgolj v laboratorijskem merilu, po drugi strani pa jih je kar nekaj primernih za preslikavo v večje merilo. Žal pa prenos v industrijsko merilo ni poceni, zato ga kapitalsko šibka lesna industrija velikokrat ne zmore (Humar in Pohleven, 2005b).

V oleseneli celični steni ima lignin podobno vlogo kot lepilo pri ploščah. Lignin med seboj povezuje celulozne mikrofibrile, podobno kot lepilo povezuje iveri oziroma lesna vlakna. V industriji ivernih plošč so že pred leti skušali nadomestiti del fenola v fenol-formaldehidnih lepilih z lignosulfonati (stranski produkti nastali v papirni industriji). V tem sistemu je bil formaldehid še vedno potreben, saj je deloval kot vezni člen med lignosulfonati in lesom. Premreženje lahko dosežemo tudi z radikalno reakcijo, ki jo sprožimo z oksidativnimi encimi lesnih gliv. Iverne plošče, izdelane po opisani metodi, so imele mehanske lastnosti primerljive z običajnimi ploščami, nabrekanje in dimenzijska stabilnost pa je bila, zaradi hidrofobnosti lignina, izboljšana (Hüttermann in sod., 2001). Zaradi visokih razvojnih stroškov raziskave še potekajo (Mai in sod., 2004).

V številnih študijah so skušali uporabiti lignin iz različnih tehnoloških procesov pridobivanja celuloze kot delno nadomestilo za fenol v fenol-formaldehidnih lepilih. Takšen lignin ima, zaradi nizke vsebnosti prostih fenolnih skupin, nizko reaktivnost. Lignin, ki ga pridobimo z lesnimi glivami rjave trohnobe, ima bistveno boljše lastnosti. V fenol-formaldehidnih lepilih so lahko s takšnimi ligninom nadomestili kar 35 % fenola. Mehanske lastnosti takšnih plošč so bile primerljive s ploščami, zlepljenimi s tradicionalnimi lepili (Mai in sod., 2004). Dodajanje z glivami proizvedenega lignina v lepila verjetno ne bo zaživelo v praksi, saj je proizvodnja takšnega lignina relativno dolga. Z glivami pridobljen lignin moramo tudi vedno okarakterizirati in ustrezno prilagoditi industrijski postopek, kar v velikoserijskih proizvodnjah ni sprejemljivo (Jin in sod., 1991).

Tudi obdelavnost lesa, ki zahteva veliko energije, se da izboljšati z uporabo biotehnologije. S tritedensko izpostavljivo sekancev glivam bele (*Trametes hirsuta*) in glivam rjave trohnobe (*Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana* in *Fomitopsis pinicola*) prihrani kar 40 % energije, potrebne za iverjenje, vlaknenje, sekanje in mletje. V tem času so glive razkrojile manj kot štiri odstotke lesne mase. Iverne plošče, izdelane iz glivam izpostavljenih sekancev, so imele primerljive mehanske lastnosti kot običajne plošče. Po drugi strani pa so imele MDF plošče, izdelane iz takšnih sekancev, trikrat boljšo upogibno trdnost in trikrat večji modul elastičnosti. Debelinski nabrek je bil zmanjšan za 60 % do 70 % (Körner in sod., 2001). Omenjeni postopek v praksi že uvajajo v nekaterih tovarnah celuloze.

Biotehnologija je omogočila tudi razvoj »miko lesa«. To je bukov les, izpostavljen glivam bele trohnobe *Pleurotus ostreatus* ali *Trametes versicolor*. Odvisno od časa izpostavitve glivam, se glede na namen uporabe uravnavajo gostota in mehanske lastnosti lesa. Lesu se zaradi delovanja gliv močno izboljša obdelavnost. Največ miko-lesa so porabili za svinčnike, barvice, ravnila, modelarstvo in laboratorijsko opremo. Trenutno v industriji te

tehnologije ne uporabljajo. Nekaj proizvajalcev svinčnikov in barvic razmišlja o ponovnem zagonu proizvodnje (Wainwright, 1992).

V skandinavskih državah, Kanadi in ZDA skušajo uveljaviti pomodrel les za izdelavo unikatnih izdelkov. Pomodrel les so na trgu ponudili pod različnimi komercialnimi imeni, najpogosteje kot denim-wood ali denim-pine (slika 1). Reklamna kampanja je bila izjemno uspešna, zato so pomodrel les začeli proizvajati v laboratorijih. Les bora so okužili s suspenzijo spor modrivrkv in po nekaj tednih so dobili enakomerno obarvan material. Iz pomodrele borovine danes izdelujejo spominke, pohištvo, talne in stenske obloge (Northern caucus, 2005).



Slika 1: Z modrivrkvami obdelana borovina, dostopna pod komercialnim imenom Denim-pine (Denime pine, 2004)

Kompostiranje je eden izmed najstarejših biotehnoloških postopkov predelave lesne surove. Uporablja se še danes, vendar ne v takšnem obsegu. Iz lesa želimo pridobiti kaj več kot le kompost. Gojenje gliv je na prvi pogled zelo podobno kompostiraju. Pri tem dobimo plodišča-gobe, preostanek, pa lahko predelamo v kompost. Gobe lahko gojimo v prehrambene (slika 2) ali pa v medicinske namene (Humar in Pohleven, 2005b).



Slika 2: Gojenje bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) na substratu iz lesne biomase (Za naravo, 2006)

Lesne glive se uporabljajo tudi v mnogih postopkih izdelave celuloze in papirja. Najpogosteje se omenja biobeljenje (biobleaching), biopulpanje (biopulping), razgradnja smol in čiščenje odpadnih vod. Lesne glive v teh postopkih lahko nadomestijo številne, okolju neprijazne kemikalije. Na tem področju poteka veliko raziskav, ki obetajo alternativne tehnološke izboljšave (Humar in Pohleven, 2005b).

## 2.3. VPLIV KOVIN NA GLIVE

Rezultat direktnih učinkov strupenih kovin so hude poškodbe v celicah organizmov. Z oksidacijo funkcionalnih skupin blokirajo ali deaktivirajo delovanje encimov (Lukens, 1971) in negativno vplivajo na permeabilnost membrane celic (Hughes, 1999). Zaradi tako raznolikih interakcij med toksičnimi kovinami in živimi organizmi (tudi glivami), je lahko prizadeta prav vsaka stopnja rasti, diferenciacije in metabolizma. Stopnja okvare je odvisna od organizma, oblike bakrove spojine in njene koncentracije ter različnih fizikalno kemijskih vplivov. Pri večini zastrupitev se najprej poškodujejo celične membrane, skozi nje zato lahko vdrejo snovi iz okolice, torej tudi ostali strupeni elementi (Cooney in sod., 1989).

Nekatere kovine so bile temelj večini fungicidnih sredstev za zaščito naravnih in umetnih materialov ter za zaščito lesa, zato je odnos med kovinami in glivami za rast gliv zelo pomemben (Horsfall, 1956). Na začetku raziskav so v večini ocenjevali toksičnost kovin, pozneje pa so podrobnejše poskušali razjasniti biološke, genetske in fiziološke vzroke strupenosti (Ashida, 1965; Gadd, 1993). Zaradi naraščanja onesnaženosti naravnega okolja s težkimi kovinami, radionuklidi in nekovinami, so bile takšne raziskave še posebej zanimive, saj so na tako onesnaženih področjih velkokrat uspevale le glive. Raziskave so se ločile v dve smeri. Ene so zajele užitne gobe in mikorizne gobe na onesnaženih območjih, druge pa so se osredotočile na razstrupitev območij, ki so bila onesnažena s kovinami in radionuklidi (Merkač, 2007).

### 2.3.1 Bistvene in nebistvene kovine za rast gliv

Kovinske elemente lahko razvrstimo po različnih kriterijih. Eden izmed možnih načinov je delitev kovinskih elementov na (Gadd, 1993):

- Bistvene elemente za rast gliv: K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Co in Ni,
- Nebistvene elemente za rast gliv: Rb, Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg in Pb.

Kovinski elementi lahko na rast gliv vplivajo posredno ali neposredno. Nekateri kovinski elementi imajo velik pomen za rast gliv, medtem ko ga drugi nimajo. Vendar pa vsi navedeni kovinski elementi reagirajo s celicami gliv in se vanje tudi odlagajo (Gadd, 1993). Nad določeno koncentracijo pa večina kovin, tako bistvenih kot nebistvenih, za rast gliv, postane strupenih. Ta koncentracija je odvisna od vrste glive, vrste kovine in vpliva okolja. Čeprav sta toksičnost in kopiranje največkrat povezani s kovinami, ki niso bistvene za rast gliv ne smemo spregledati tudi bistvenih kovin. Toksičnost se pri bistvenih kovinah pogosto doseže pri nižjih koncentracijah, kot pri nebistvenih kovinah. Dober primer za to je baker, ki je nujno potreben za rast, a že pri nekoliko višji koncentraciji postane toksičen (Carlile in Watkinson, 1994).

Razdelitev kovin na toksične in netoksične za glive je dokaj tvegana, saj na toksičnost vpliva toliko različnih faktorjev, da je stroga razmejitev zelo težka. Živi organizmi se poslužujejo raznih mehanizmov, ki potencialno toksične kovine spremenijo v netoksične. Ti procesi lahko potekajo v povezavi z normalnim metabolizmom ali pa neposredno od njega. Pri tem so vplivi okolja zelo pomembni. Problem predstavlja dejstvo, da ta delitev ne zajema nekovin, ki z glivami reagirajo kot kovine in so morebiti celo fungicidno aktivne (Merkač, 2007).

Med kovinami ima posebno mesto 65 težkih kovin, ki so večinoma biološko aktivne. Obstaja pa še skupina, organokovinskih spojin, ki jo sestavljajo kovine, na katere je vezana organska molekula z vsaj eno ogljikovo vezjo. Te spojine lahko delujejo fungicidno ali pa se pojavljajo kot metabolni produkt gliv (Gadd, 1993).

### **2.3.2 Odpornost in tolerantnost gliv na kovine**

Toleranca na neko škodljivo snov je sposobnost organizma, da zaradi svojih specifičnih mehanizmov, s katerimi zmanjša toksičnost te snovi, npr. kovine, zmore preživeti na močno kontaminiranem gojišču (Gadd, 1993). Glede razširjanja tolerantnih organizmov obstajata dve teoriji. V prvi so tolerantni organizmi del naravnega okolja, katerih se ne da vzgojiti iz netolerantnih sevov. Zvišane koncentracije bakra in ostalih težkih kovin v zemlji, kot posledica onesnaženja, navadno ne povzročijo nastanka tolerantnih organizmov. Vodijo pa do zmanjšanja raznolikosti, preživijo le najbolj odporni in se bolj širijo kot bi se sicer (Woodward in De Groot, 1999). V drugi teoriji pa bi prisotnost pravšnje koncentracije bakra oziroma druge kovine v podlagi lahko povzročila razvoj tolerantnejših organizmov (Jellison in sod., 1997).

## **2.4 LASTNOSTI BAKRA IN KOSITRA**

### **2.4.1 Baker**

Letno se za zaščito lesa po svetu porabi več kot 100.000 ton pripravkov na osnovi bakra (Hughes, 1999; Preston, 2000). Za bakrove spojine velja, da se njihova poraba ne zmanjšuje, ampak celo narašča, za kar je več razlogov (Humar in Pohleven, 2005a):

- bakrovi pripravki so že v relativno nizkih koncentracijah strupeni za glive, bakterije in alge, na višje rastline pa ne delujejo strupeno. V nizkih koncentracijah je baker celo nujno potreben za njihov normalni razvoj (Gupta, 1979),
- zaščitna sredstva na osnovi bakra so sorazmerno poceni in relativno varna v primerjavi z ostalimi biocidi (Richardson, 1997),
- prepoved oziroma omejitev uporabe nekaterih klasičnih zaščitnih sredstev za les zaradi strupenosti ali njihove okoljske neprimernosti (pentaklorofenol, DDT, Lindan) (Pohleven, 1998),
- hiter razvoj dežel tretjega sveta in s tem povezana večja potreba po zaščitenem lesu (Richardson, 1997)

Baker se največkrat uporablja v obliki bakrovega sulfata, bakrovega hidroksida-karbonata ali bakrovega oksida. Za zaščito lesa se je najprej pričel uporabljati bakrov sulfat, (1838) s patentiranjem Boucherie postopka za zaščito sveže posekane hlodovine. Vodna raztopina

bakrovih pripravkov je rahlo modre barve, iz lesa se bakrove učinkovine izpirajo in delujejo nekoliko korozivno. Baker se uporablja samostojno kot fungicid ali pa v kombinaciji z drugimi solmi (kromove, arzenove, borove...) oziroma spojinami (amini, amoniak, kvartarne amonijeve spojine, triazoli...) in je najbolj razširjen biocid v agronomiji in lesarstvu. Največja slabost bakrovih spojin je slaba fiksacija v les in s tem povezana velika izpirljivost iz lesa. To pa je velik okoljevarstveni problem, saj je baker zelo nevaren za vse vodne organizme. Kasneje so uveljavili zaščitna sredstva na osnovi bakra, ki se ne izpirajo in hkrati ščitijo les pred glivami in algami, poleg tega pa preprečujejo tudi usidranje morskih škodljivcev na podvodne dele ladij in lesenih konstrukcij. Zaščitna sredstva na osnovi bakra so imela dodatek kroma (Hughes, 1999), ki omogočajo, da pride do reakcije med bakrovimi ioni in hidroksilnimi skupinami na komponentah lesa.

Zaradi nezaželenosti kromovih spojin se iščejo nadomestila za krom, ne da bi s tem zmanjšali fiksacijo pripravka. Ena od možnih rešitev je uporaba vodne raztopine amoniaka (Pohleven in sod., 1994; Dagarin in sod., 1996). Ti pripravki se niso uveljavili zaradi ostrega vonja, draženja in neprimerne videza lesa. Namesto amoniaka so se začeli uvajati amini (Tang in Ruddick, 1994; Zhang in Kamdem, 2000).

O vezavi in reakciji aminov z bakrom pa je znano zelo malo, saj so ti zaščitni pripravki za les razmeroma novi, zato so preučevanja osredotočena predvsem na njihovo fiksacijo v les (Hartley in Kidd, 1987; Lewis, 1992; Jiang in Ruddick, 1999).

Amini naj bi po impregnaciji iz lesa izpareli, pri čemer se v lesu tvorijo slabo topne bakrove spojine. Zadnje raziskave zaščitnih sredstev na osnovi aminov so pokazale, da ne izpari ves in da ga nekaj reagira z lesom (Ruddick in Xie, 1995), še posebej etanolamin, ki ga množično uporabljamo v nekaterih komercialnih zaščitnih pripravkih. Večina bakra naj bi se pri tem sistemu vezala na lignin, nekaj pa naj bi ga reagiralo z ekstraktivi in hemicelulozami, najmanj pa s celulozo (Humar in sod., 2003). Del, ki ostane, pa je koordiniran na baker (Pohleven in sod., 1994; Humar, 2002). Na hitrost reakcije med karboksilnimi skupinami lesa in aminskim kompleksom bakra pa ima velik vpliv pH vrednost raztopine. Višji pH pripravka povečuje absorpcijo bakra ter vpliva na enakomernejšo porazdelitev zaščitnega sredstva po celični steni (Cooper, 1998; Zhang in Kamdem, 2000).

V zadnjem času se vedno bolj uveljavljajo tudi bakrove spojine v obliki nano suspenzij. Ker je baker v nano oblikah, lahko v suspenziji dobro prodre v les, ko pa topilo izhlapi, se suspenzija obori in se iz lesa praktično ne izpira več. Bakrovi nano pripravki se trenutno uporabljajo le v ZDA, v bližnji prihodnosti pa bodo prodrali tudi na evropsko tržišče.

#### 2.4.1.1 Delovanje bakra

Baker je eden izmed sedmih bistvenih elementov, ki so potrebni za rast rastlin in gliv (Pohleven in sod., 1994), višje koncentracije pa delujejo fungicidno (Gupta, 1979). Kljub dolgotrajni in množični uporabi bakrovih pripravkov v fungicidne namene, njihovo delovanje na glive še ni v celoti pojasnjeno, saj je njihovo delovanje zelo nespecifično. Znano je, da mora biti aktivna bakrova komponenta za fungicidne namene raztopljena v

vodnem okolju, saj neraztopljene bakrove spojine delujejo kot zaloge iz katerega se po potrebi sprošča baker v biološko aktivno obliko. Baker je pomemben za delovanje metabolnih procesov gliv. Poznanih pa je vsaj trideset encimov, v katerih nastopa (Richardson, 1997).

Pri posrednem vplivu baker povzroči nastanek prostih radikalov, ki lahko sprožijo verižno reakcijo depolimerizacije organskih makromolekul. Ker prosti radikali nastajajo tudi pri normalnem metabolizmu, glive preprečijo depolimerizacijo s tvorbo zaščitnih encimov, ki so učinkoviti oksidanti. Ti encimi ponavadi vsebujejo naslednje kovine: Mn, Fe, Zn ali Cu (Greco in sod., 1990). Encimi so učinkoviti do določene koncentracije prostih radikalov, če je le teh preveč, svoje funkcije ne zmorejo več uspešno opravljati.

#### 2.4.1.2 Izpiranje bakra iz lesa

Iz vzorcev, impregniranih s pripravki na osnovi bakra in kroma, se povprečno izpere med 0,1 % in 0,5 % navzetega bakra (Humar in sod., 2005). Za vezavo v les imata velik vpliv sestava in koncentracija zaščitnih pripravkov. Dodatek kobiocidov, ki so potrebni za zaščito pred najodpornejšimi lesnimi glivami, večinoma negativno vpliva na vezavo bakrovih učinkovin (Petrič in sod., 2004). Pri impregnaciji z manj koncentriranimi pripravki, se je zaradi velike puferske kapacitete lesa (Albert in sod., 1999) pH sistema pomaknil od bazičnih proti nevtralnim vrednostim, kar se kaže v slabši vezavi v les. Po drugi strani pa, če v les vnesemo preveliko količino bakrovih učinkovin, zmanjka reakcijskih mest v lesu, zato se del bakrovih učinkovin le obori v celičnih lumnih, ko se les posuši. Zaradi slabših interakcij z lesom, so te bakrove spojine bolj dovetne na izpiranje kot tiste, ki so na les kemijsko vezane (Humar, 2006).

Na izpiranje bakrovih učinkovin iz lesa vpliva več dejavnikov. Ti dejavniki so čas in temperatura fiksacije, postopek zaščite ter drevesna vrsta. Čas ima velik pomen pri vezavi pripravkov na osnovi bakra in kroma, saj sredstvo potrebuje 28 dni za fiksacijo (Kervina-Hamovič, 1990; Richardson, 1993). Tudi postopek zaščite ima velik vpliv na izpiranje bakrovih učinkovin iz lesa. Načeloma se iz premazanih vzorcev izpere večji delež bakrovih učinkovin kot iz vakuumsko impregniranih ali potapljanih vzorcev (Humar in sod., 2007). Bakrovi pripravki se ne vežejo v vse lesne vrste enako učinkovito. Bolje se vežejo v les iglavcev kot v les listavcev (Pečenko, 1987). Ne glede na to, ali za izpiranje uporabimo destilirano, rečno, morsko ali navadno vodovodno vodo, lastnosti vode bistveno ne vpliva na izpiranje bakrovih biocidov iz lesa (Humar in sod., 2006).

#### 2.4.1.3 Toleranca gliv na baker

Čeprav je toleranca posameznih vrst gliv na baker je že dolgo znana (Hirt, 1949; Zabel, 1954; Da Costa, 1959), pa je mehanizem tolerance še vedno nepojasnjen (Tsunoda in sod., 1997; Pohleven in sod., 1999). Toleranca gliv na baker močno variira tako med posameznimi vrstami, kot med posameznimi izolati (Zabel, 1954; Da Costa, 1959).

Nizke koncentracije bakra v substratu pri nekaterih manj tolerantnih sevih gliv bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*) lahko pospešijo njihovo rast, pri bolj tolerantnih glivah pa tega niso opazili (Collet, 1992). Toleranca posamezne vrste ali seva je odvisna tudi od sestave

pripravka, s katerim bomo les zaščitili (Woodward in De Grott, 1999). Na strupenost bakra za glice ima velik vpliv tudi pH rastišča, saj je baker za glice manj strupen pri kislih vrednostih podlage (pH 2), kot pri nevtralnih vrednostih (Starkey, 1973).

Glice bele trohnobe so načeloma manj tolerantne na zvišanje koncentracije bakra kot glice rjave trohnobe (Tsunoda in sod., 1997). To dejstvo dobro sovpada s podatki o izločanju oksalne kislino, kar kaže na pomembno vlogo te kislino pri mehanizmu tolerance. Ugotovili so, da glice bele trohnobe izločajo manj oksalne kislino kot glice rjave trohnobe (Takao, 1965). Največja toleranca je bila opažena pri povzročiteljicah rjave trohnobe iz rodov *Poria* in *Antrodia* in temu rodu sorodnih vrstah (Schmidt in sod., 1981).

Odkrili so, da nekateri sevi bele hišne gobe deaktivirajo baker v lesu (Sutter in sod., 1983). Iz lesa so po obdelavi s to gobo v treh do osmih tednih odstranili v povprečju 75 % celotnega bakra. Pohlevnu in sodelavcem (1999) pa transporta bakra ni uspelo dokazati v eksperimentu s *Porio monticolo* na hranilnem gojišču. To nakazuje, da moramo biti pri interpretaciji rezultatov, s katerimi skušamo pojasniti toleranco, previdni, saj se gliva oziroma izolat odziva drugače, če raste na lesu, kot na hranilnem gojišču (Sutter in sod., 1983). Pri preraščanju zaščitenega lesa so se glice izkazale kot manj tolerantne v primerjavi s hranilnim gojiščem z dodanim bakrom (Rodney in sod., 1998), saj imajo na umetni hranilni podlagi boljše pogoje za rast, torej tudi večjo zmožnost, da kljubujejo zavirальнemu učinku bakra.

Med glivnim razkrojem zaščitenega lesa bakrovi ioni v lesu reagirajo z oksalno kislino in pri tem nastane v vodi netopen bakrov oksalat. Glice s transformacijo bakrovih aktivnih komponent v netopen bakrov oksalat povzročijo, da ta postane zanje neškodljiv (Sutter in sod., 1983; Richardson, 1997; Pohleven in sod., 1999). S poskusi so dokazali, da glice lahko uspevajo na podlagi, ki vsebuje velike količine bakrovega oksalata (Sutter in sod., 1983). Pri tolerantnih izolatih, ki so rasli preko kontrolnih vzorcev, so na hifah dokazali kalcijev oksalat. Zato lahko domnevam, da je tvorba bakrovega oksalata v lesu, zaščitenem z bakrovimi pripravki, zelo podobna tvorbi kalcijevega oksalata v nezaščitenem lesu (Stephan in sod., 1996). Zakisanje lesa, zaščitenega s kromovimi in bakrovimi pripravki in izpostavljenega razkroju s tolerantnimi glivami, je v veliki meri odvisno od tolerantnosti uporabljenega seva. Izolati, ki so že v začetnih fazah razkroja uspešno zakisali les, so se izkazali za tolerantne, vendar se intenziteta zakisanja ni pokazala kot edini splošni pogoj za tolerantnost. Izločanje oksalne kislino je potreben, a ne zadosten pogoj (Stephan in sod., 1996).

S pretvorbo bakra v bakrov oksalat lahko pojasnimo pomemben del mehanizma tolerance gliv na baker, ne pa celotnega pojava. Določeno vlogo pri tem igrata verjetno tudi absorpcija bakra v celice gliv (Pohleven in sod., 1999). Pri različnih sevih gliv so bili opaženi različni deleži bakra v celičnih protoplastih (Sutter in sod., 1983), precej bakra pa so našli tudi na hifah gliv v okolini z bakrovimi pripravki zaščitenega lesa (Tsunoda in sod., 1997).

Na tolerantnost gliv vpliva tudi prisotnost izvenceličnega sluzastega materiala (ECMM) oziroma tako imenovanega ščita (Vesentini in sod., 2004), ki ga izločajo različni organizmi, med drugim tudi glice, bakterije in alge ter ima precej raznovrstnih funkcij.

Vesentinijeve raziskave (2004) radialne rasti nekaterih vrst lesnih gob z in brez ECMM kažejo, da le-ta dodatno ščiti hife pred strupenimi učinki bakra. Del bakrovih ionov se veže na polisaharide in komponente z manjšo molekulsko maso, ki sestavljajo ECMM in s tem zmanjšuje prehod bakrovih ionov v hife.

#### **2.4.2 Kositer**

Organo kositrove spojine ( $R_3SnX$ ). R je alkilna ali arilna skupina, Sn je znak za kositer, X označuje anionski radikal. Kot sredstva za kemično zaščito lesa so postala znana v osemdesetih letih 20 stoletja, zaradi manjše toksičnosti za sesalce v primerjavi s klasičnimi pripravki kot so PCP, Lindan in DDT. Najbolj znan je tributilkositrov oksid (TBTO); je bil sestavni del številnih organskih biocidnih pripravkov, ki so se uporabljali za zaščito stavbnega pohištva (Kervina-Hamović, 1990). Danes so organo kositrove spojine v EU prepovedane.

Od organskih kositrovih spojin so se za zaščito lesa najbolj uveljavile tributil kositrove spojine, ki so najboljši kompromis med strupenostjo za sesalce in aktivnostjo proti glivam in insekticidom. Včasih so ga uporabljali kot antiseptik in kot antihelminitik, torej proti eukarionskim zajedavcem (črvi, gliste, trakulje) in proti pripenjanju organizmov na ladje in čolne, saj moti živčne signale v teh organizmih ter jih ubija. Določene organo-kositrne spojine so toksične zaradi motenja encimov v dihalni verigi (Farmacevtska kemija-1, 2009). V lesu se kemično vežejo s celulozo, zato dobro zaščitijo pred rjavo, slabše pred belo trohnobo. Kemično so relativno stabilne, če se razgrajujejo v nižje substiuente spojine in končno v elementarni kositer, postajajo vse manj biološko aktivne, pa tudi manj toksične za sesalce. Tributil kositrov oksid (TBTO) je najbolj razširjen in učinkovit; njegovi višjemolekularni estri so, zaradi manjše vsebnosti kositra biološko, manj aktivni in ekonomični, vendar tudi manj hlapni in odbojnješi za vodo. V sredstvih za zaščito lesa je TBTO pogosto kombiniran s pomožnim fungicidom, ki dopolni njegovo sicer nezadostno aktivnost proti glivam modrkvam. TBTO je dobro topen v organskih topilih; v prisotnosti tudi sicer fungicidnih kvartarnih amonijevih spojin, ki so znana površinsko aktivna sredstva, pa je mogoče TBTO emulgirati v vodi in doseči ekonomičnost (cena : učinkovitost), ki se približuje CCA pripravkom (Pečenko, 1987).

Organokositrove spojine so se še posebej pogosto uporabljale za zaščito podvodnih delov plovil pred obraščanjem morskih organizmov. Morski organizmi pritrjeni na plovila namreč močno povečajo upor in s tem povečajo porabo goriv. Ugotovljeno je bilo, da kositrove spojine že v nizkih koncentracijah lahko poškodujejo živčne sisteme morskih sesalcev. S tem razlagajo tudi nenadzorovano nasedanje kitov in delfinov na pečine. Zaradi okoljskih razlogov organokositrovih spojin za zaščito manjših plovil v EU ne uporabljamo več. Še vedno pa se velike količine organokositrovih spojin porabi za zaščito ladij in tankerjev v neevropskih državah in davčnih oazah, kjer je registriranih večina večjih plovil.

## 2.5 BIOFILTRACIJA

Biofiltracija je tehnološki postopek biološkega čiščenja odpadnih vod s pritrjeno biomaso, pri kateri se odpadna voda prefiltrira skozi fiksen sloj. Nosilci za pritrjeno biomaso so lahko okrogli delci ekspandirane gline z natančno določeno velikostjo in gostoto, ki tvorijo fiksen sloj nosilcev obraslih z biomaso (Pipuš, 2007). Biološka razgradnja odpadnih vod je odvisna od mnogih dejavnikov. Ti dejavniki so sestava vode, koncentracija mikroorganizmov, koncentracija kisika in temperatura.

Biološke čistilne naprave in biofiltri se med seboj razlikujejo, saj je vsaka naprava in filter prilagojen zahtevam in potrebam njihovih uporabnikov. V vseh čistilnih napravah pa potekata dva procesa, primarno (mehanska obdelava, usedanje, flotacija...) in sekundarno čiščenje (odstranjevanje organskih snovi, nitrifikacija, denitrifikacija, defosforizacija...).

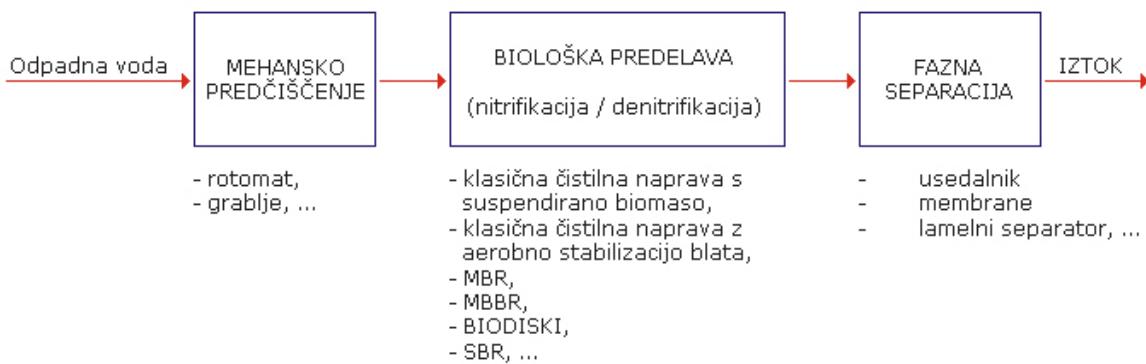
V procesu filtracije se suspendirane snovi izločijo iz odpadne vode in ostanejo ujete med nosilce biomase. Zaradi izločenih suspendiranih snovi v procesu filtracije in prirasle biomase, upor proti toku odpadne vode skozi biofilter počasi raste. Zato je potrebno biofilter občasno sprati. Spiranje poteka s kombinacijo očiščene vode in zraka (Pipuš, 2007). V primeru, da z biofiltracijo skušamo iz vode odstraniti težke kovine, moramo strnjen sloj vsake toliko časa povsem zamenjati.

Sekundarno čiščenje se izvaja z mikroorganizmi in glivami, ki so občutljivi na presežek težkih kovin. Med težke kovine spadata tudi baker in kositer, ki smo ju uporabili v diplomske naloge.

### 2.5.1 Opis tehnološkega postopka biološkega čiščenja

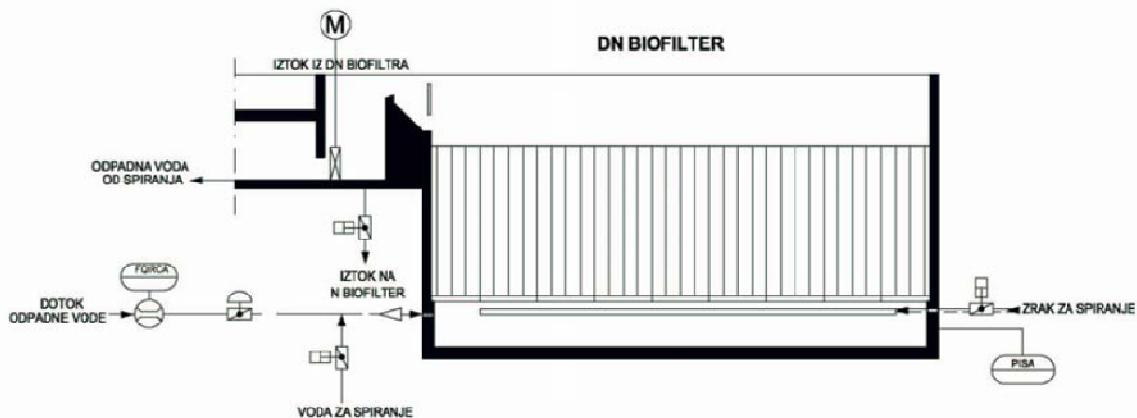
Odpadna voda se najprej mehansko očisti. Z grabljami ter filtri odstranimo trde delce in s tem preprečimo, da bi se šobe v biofiltrih zamašile (slika 3).

Dotok odpadne vode na biofilter je reguliran in točno določen. Z regulacijo pretoka vode pa reguliramo tudi doziranje kemikalij za izločanje fosforja. Postopek se imenuje koagulacija in poteka s pomočjo tehnične raztopine  $\text{FeCl}_3$ .



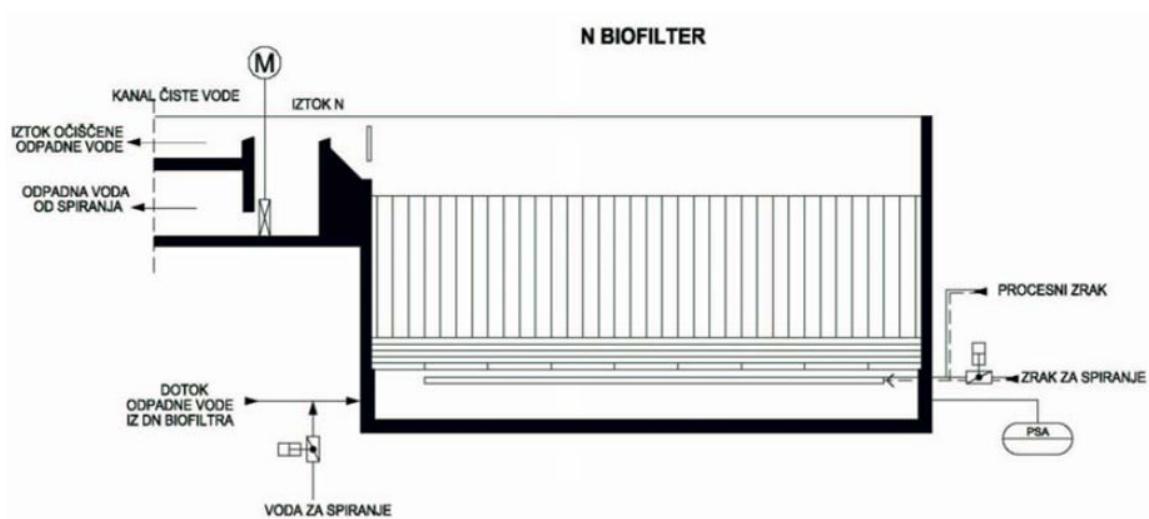
Slika 3: Biološko čiščenje (COM-teh, 2008)

Biološko čiščenje se nadaljuje z denitrifikacijo (odstranjevanje dušika) in nitrifikacijo. Denitrifikacija je proces, pri katerem iz nitratnega dušika nastaja atmosferski dušik, poteka pa v anoksičnem okolju v več stopnjah. Gre za heterotrofno rast, kjer ob odsotnosti kisika kot elektronski akceptor nastopa nitrat. Ker redukcija nitratnega dušika v  $N_2$  odstranjuje dušik iz odpadne vode, se proces imenuje denitrifikacija. Do denitrifikacije pride, ko je koncentracija kisika nizka in je prisotna organska snov. Filtrirni material je visok 3,0 m in vsebuje ekspandirano glino s premerom 4 mm do 8 mm, ki se uporablja kot nosilec za biomaso. Dotok v biofilter je od spodaj (slika 4) skozi talno ploščo s šobami, nato teče skozi filtrirni sloj in odteka na vrhu preko pregrade v naslednji biofilter kjer se izvaja nitrifikacija.



Slika 4: Shema delovanja denitrifikacijskega biofiltrata (Pipuš, 2007)

Nitrifikacija je proces, v katerem nastopijo bakterije, ki za obstoj potrebujejo kisik (aerobne bakterije) in se uspešno ter hitro razmnožujejo v zanje ugodnih pogojih (veliko organskih snovi in dovolj kisika). Hraneč se z organsko materijo, višjo oksidacijo in izločajo ostanke v obliki mineralnih snovi (mineralizacija organske materije). V aerobnih pogojih lahko odstranjujemo iz odpadne vode razgradljive organske spojine, istočasno pa poteka v sistemu tudi pretvorba organskega dušika najprej v amonijev obliko ( $NH_4^+$ ), nato oksidacija amonijevega iona v nitrit ( $NO_2^-$ ) in nato v nitrat ( $NO_3^-$ ). Tu je filtrirni material višji (3,7 m) in sestavljen iz manjših delcev ekspandirane gline (2,5 mm - 5 mm). Biofilter za nitrifikacijo (slika 5) je sestavljen podobno kot denitrifikacijski biofilter, le da je na vrhu talnih plošč sloj peska, ki varuje zamašitev šob s filternim materialom, ki je v nitrifikacijskem filtru bolj droben. Sledi lahko terciarno čiščenje, ki zajema fazno separacijo. Nato pa se voda izteka v izčistilne naprave v reko.



Slika 5: Shema delovanja nitrifikacijskega biofiltra (Pipuš, 2007)

## 2.6 BIOFILTRACIJA TEŽKIH KOVIN

Kot je bilo že omenjeno, je potrebno iz vode pred postopkom biološkega čiščenja izločiti težke kovine. Težke kovine lahko pomorijo kulturo mikroorganizmov v čistilnih napravah in jih s tem povsem uničijo. Biofiltracija težkih kovin temelji na absorpciji težkih kovin na organskih matriksih. V te namene se uporablja matriks z veliko sposobnostjo absorpcije. Les ima veliko sposobnost absorpcije, zato je že samo po sebi zelo primeren material za postopke biofiltracije. Sposobnost absorpcije pa smo mu želeli izboljšati s predhodno izpostavitvijo glivam. S tem bi poleg lesa v matriks uvedli še hife, ki imajo hitin. Hitin, za katerega je ravno tako znano, da ima veliko sposobnost absorpcije.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Substrat

Za substrat za rast gliv smo uporabili bukove skobljance, smrekovo žaganje ter pšenične otrobe. Iz tega materiala smo pripravili primeren gojitveni medij za glive bele in rjave trohnobe.

##### 3.1.2 Vrste gliv

Za izvajanje testov smo uporabili glive, ki povzročajo rjavo ali pa belo trohnobo. Izolate gliv smo dobili v banki gliv Delovne skupine za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti.

Uporabili smo naslednje izolate gliv:

- Bela trohnoba:
  - pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)
  - ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*)
  - bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)
- Rjava trohnoba:
  - bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*)
  - navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*)

Preglednica 2: Glive, razkrojevalke lesa, uporabljene pri eksperimentalnem delu diplomske naloge

Vrsta trohnobe	Slovensko ime	Latinsko ime	Poreklo	Oznaka
Bela trohnoba	pisana ploskocevka	<i>Trametes versicolor</i>	ZIM L057	Tv
	ogljena kroglica	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	ZIM L108	Hf
	bukov ostrigar	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ZIM L030	Plo <sub>5</sub>
Rjava trohnoba	bela hišna goba	<i>Antrodia vaillantii</i>	ZIM LO37	Pv <sub>2</sub>
	navadna tramovka	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	ZIM L018	Gt <sub>2</sub>

###### 3.1.2.1 Opis gliv

###### 3.1.2.1.1 Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)

Je ena najbolj pogostih gliv pri nas, pa tudi po svetu. Pojavlja se na lesu listavcev, najraje na bukovini. Strohnel les je značilne bele barve, saj pisana ploskocevka razkraja predvsem lignin. Ob hkratni okužbi lesa z več vrstami lesnih gliv povzroča piravost, kar se odraža v neenakomernem razkroju in temnih črtah. Tanki klobučki, ki zrastejo iz podgobja snežno bele barve, so usnjato žilave strukture (slika 6). Veliki so od 5 cm do 9 cm. Izraščajo v skupinah eden vrh drugega. Trosnjaki so koncentrično obarvani od svetlo do temno rjave barve, okrasto rdeče do sive pa vse do črno modre barve. Robovi so vedno svetlejši, pri mladih gobah beli. Trosovnica (spodnja stran) je bela, sestavljena iz kratkih cevk iz katerih se dnevno sprosti na milijone belih trosov. Goba ni užitna ima pa številne zdravilne učinke.

Kot zdravilo se uporablja v čajih, predvsem za izboljšanje imunskega sistema ter proti prehladom in drugim virozam. V obliki kapsul, ki vsebujejo polisaharide pisane ploskocevke, deluje proti raku. Uporablja se pri uničevanju impregniranega (zaščitenega) lesa, razstrupljanju polj. Postopek razstrupljanja odpadkov in zemlje z glivami imenujemo mikoremediacija (Pohleven, 2008).



Slika 6: Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*) (Discover Life, 1995)

### 3.1.2.1.2 Ogljena kroglica (*Hypoxyylon fragiforme*)

Ogljena kroglica je ena redkih vrst gliv iz skupine zaprtotrosnic (Ascomycotina), ki povzroča belo trohnobo in piravost. Je zelo pogost saprofit bukve in drugih listavcev, kot so jelša, breza, gaber, topol, hrast in lipa, pa tudi na lesu nekaterih palm. Gliva je zelo agresivna, saj v laboratorijskih pogojih v 16 tednih razkroji povprečno 40 % mase bukovina, ter se lahko na lesu zadrži tudi več let. Plodišča imajo obliko kroglic (slika 7), premera od 2 mm do 9 mm. Površina kroglice je hrapava in trda. Mlade so sive barve, zrele pa temno rjave barve, ko se sprostijo spore pa postanejo črne kot oglje. Sredica je svetlejša, iz nje pa so včasih z ekstrakcijo s kalijevim hidroksidom pridobivali oranžno barvilo. Iz plodišč so izolirali zdravilne učinkovine (fragiformine), ki zavirajo napredovanje AIDS-a pri HIV pozitivnih bolnikih. Mlada plodišča vsebujejo učinkovine z baktericidnim in fungicidnim delovanjem. Lahko bi jo uporabili tudi za čiščenje s pesticidi onesnaženega okolja (bioremediacija) (Humar, 2009).



Slika 7: Ogljena kroglica (*Hypoxyylon fragiforme*) (Spletni albumi Picasa, 2008)

### 3.1.2.1.3 Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)

Bukov ostrigar je razširjen v zmernem in subtropskem podnebnem pasu severne poloble. Gliva je tipičen saprofit, ki ga najdemo predvsem na lesu listavcev (najpogosteje na bukovini) zelo redko pa tudi na iglavcih. Povzroča tipično belo trohnobo. Micelij je usnjat in bele barve. Plodišča so sestavljena iz klobuka z betom. Klobuk po obliku spominja na školjko (slika 8) in doseže premer 5 cm do 15 cm, ki je sivorjave do rumenkaste barve. Navadno izraščajo v šopih. Lamele trosišča na spodnji strani so belkasto rjave barve in so prirrasle k betu. Bukovemu ostrigaru ustreza temperatura okoli 27 °C ter vlažnost lesa med 60 % in 80 %. Pri teh pogojih lahko gliva priraste tudi 7,5 mm dnevno. Gliva bukov ostrigar in plodišče imata velik spekter uporabnosti. Plodišče je užitno in se pogosto goji za prehrambene namene, gliva pa se uporablja za testiranje odpornosti ivernih in OSB plošč proti trohnenju. Micelij lahko uporabimo tudi za razstrupljanje zemlje, okužene z odpadnimi olji, pesticidi ali biocidi (mikoremediacija). Poleg tega je micelij bukovega ostrigara lahko odličen biofilter ali celo biokontrolni agent. V zadnjem času pa dobiva pomen uporabe te glive v medicinske namene. Uživanje bukovega ostrigara deluje protivnetno, uravnava krvni tlak, znižuje raven sladkorja in holesterola v krvi, pospešuje prebavo, celjenje ran ter izboljšuje delovanje imunskega sistema (Humar, 2008b).



Slika 8: Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) (Mycotopia, 2006)

### 3.1.2.1.4 Bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*)

Belo hišno gobo najdemo v zmernem kot tudi v tropskem pasu v Evropi, Aziji, Avstraliji, Afriki. Bela hišna goba pogosteje okužuje zelo vlažen les iglavcev, še posebej, če se na lesu nabira kondenzirana voda. Pogosto se nahaja v kleteh, rudnikih, na lesu na skladiščih, v gozdu na podzemnih delih hlodovine in drugih zelo vlažnih okoljih. Ta vrsta je tipičen predstavnik rjave trohnobe. Razkrojen les prizmatično razpoka. Trošnjaki bele hišne gobe so v naravi redki, pogosto pa se pojavijo v laboratoriju na starih hraničnih gojiščih. Trošnjak je blazinast, obrnjen navzgor in dobro prirasel na podlago. Trosovnica je sestavljena iz značilnih oglatih cevčic, ki so nepravilnih oblik. Micelij in rizomorfi so gladki in bele barve ter ostanejo prožni tudi, ko gliva odmrte. Na lesu se pogosto razrašča v obliku ledene rože na oknih, ki ga z lahkoto odstranimo s površine (slika 9). Bela hišna goba najbolje uspeva med 26 °C in 27 °C ter med 35 % do 45 % vlažnosti lesa. Razkraja le

vlažen les, lahko pa preživi večletna sušna obdobja. V optimalnih pogojih dnevno zraste tudi do 12,5 mm. Ta gliva med razkrojem močno zakisa les z izločanjem oksalne kisline, zato v okuženem lesu najdemo kristale kalcijevega oksalata. Za belo hišno gobo je značilna visoka toleranca na bakrove pripravke. Nekateri izolati lahko rastejo celo na hranilnem gojišču, ki vsebuje 8000 ppm bakra ali impregniranem lesu, ki vsebuje do 30 kg bakra/m<sup>3</sup>. toleranca na baker je povezana z velikim izločanjem oksalne kisline, ki z bakrovimi učinkovinami tvori v vodi netopne in zato biološko neaktivne komplekse bakrovega oksalata. Toleranca na baker po eni strani predstavlja težavo, saj sodijo ti pripravki med najbolj razširjena zaščitna sredstva za les, po drugi strani pa tolerantne izolate bele hišne gobe v biotehničkih procesih lahko uporabimo za mikoremediacijo odsluženega zaščitenega lesa (Humar, 2008a).



Slika 9: Bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*) (Holz-schimmel, 2005)

### 3.1.2.1.5 Navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*)

Tramovke najdemo praktično po vsem svetu, razen v tropskih in puščavskih predelih. Okužijo predvsem tehničen les, ki se občasno navlaži, kot so okna, mostovi, lesena plovila, ograje... Navadna tramovka razkraja tako listavce pa tudi iglavce. Povzroča tipično rjavo trohnobo. Razkrojen les se cepi po letnicah v obliki različno velikih prizem in ima značilen sladek vonj. Razkroj opazimo pozno, saj glive pustijo zunanjo plast nerazkrojeno. Trosnjaki so enoletni in jih je ponavadi več skupaj zraščenih v izrazito vrsto. Klobuki so žilavi in prožni (slika 10). Večinoma zrastejo iz razpok. Na zgornji strani klobuka so dobro razvidne rjave koncentrične prirastne plasti. Površina je rahlo razbrazdana. Navadna tramovka ima plodišča oker do rjave barve z najgostejšimi lamelami od 20 do 40 lamel na cm. Optimalna temperatura za razvoj je med 26 °C in 35 °C, maksimalna 40°C, minimalna pa 5 °C. optimalna vlažnost lesa je med 40 % in 60 %. Še posebej jim ustreza vlaga, ujeta v les, iz katerega ne more hitro izhlapeti (Humar, 2008c).



Slika 10: Navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*) (Wikimedia commons, 2007)

### 3.1.2 Tehnična sredstva

- Aparature in instrumenti

rastna komora, avtoklav, sušilnik, laminarij oziroma brezprašna komora, analitska tehnilica (natančnost 0,0001 g), elektronska tehnilica (natančnost 0,001 g), pH meter, Rentgenski fluorescenčni spektrometer (XRF), stiskalnica, grelnik, špiritni gorilnik, vodna črpalka

- Laboratorijski pripomočki

čaše, merilni valji, epruvete, stojalo za epruvete, steklene palčke, pipete, špatula, steklene bučke, EN 113 kozarčki, plastični filter

- Potrošni material

filtrirni papirčki, folija, prozorno plastično folijo za XRF (Mylar, Oxford Instruments), papir za avtoklaviranje, konice za pipete, propilenske vrečke, vata

- Zaščita pri delu

rokavice in zaščitna halja

- Uporabljene kemikalije

modra galica ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ), tributilkositrov oksid ( $\text{C}_{24}\text{H}_{54}\text{OSn}_2$ ) (TBTO), pufri (pH 3 in 7), destilirana voda, krompirjev glukozni agar (PDA – potato dextrose agar – DIFCO Laboratories, USA)

### 3.2 METODE

Diplomsko delo je bilo sestavljeni iz več delov. V prvem smo izvedli presejalni test in ugotavljali odpornost nekaterih gliv na kositer in baker. Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili s katerimi glivami smo okužili les za biofiltracijo. Po biofiltraciji smo v substratu in v odpadni vodi izmerili količino navzetega bakra z rentgensko fluorescenčno analizo (XRF). Pred začetkom biofiltracije in po njej pa smo izmerili spremembo pH vrednosti uporabljenih raztopin.

### 3.2.1 Presejalni test

S presejalnim testom smo ugotavljali tolerantnost gliv na različna zaščitna sredstva. V hranilna gojišča smo dodali sredstvo (v več različnih koncentracijah), nato smo gojišča inokulirali (okužili) s testnimi glivami in spremljali preraščanje medija. Preraščanje glive smo ocenjevali v primerjavi s priraščanjem na kontrolnih hranilnih gojiščih (brez dodanega sredstva). Presejalni testi so hitri in poceni, saj trajajo največ teden ali dva. Na osnovi dobljenih rezultatov smo izbrali nekaj najobetavnejših gliv in z njimi izvedli še vsa nadaljnja testiranja.

#### 3.2.1.1 Priprava hranilnega gojišča

Kot hranilni medij smo uporabili krompirjev glukozni agar (PDA – potato dextrose agar – DIFCO Laboratories, USA). Hranilno gojišče smo pripravili po navodilu proizvajalca, za 1,0 L destilirane vode smo potrebovali 39 g hranilnega gojišča v prahu. Pripravili smo hranilno gojišče za 150 epruvet po 10 mL hranilnega gojišča, tako da smo skuhali količino 1700 mL gojišča. Stehtali smo 66,3 g hranilnega gojišča v prahu, ter mu dodali nekaj destilirane vode ter dobro premešali. Preostanek destilirane vode smo zavreli v loncu, ter mu dodali mešanico destilirane vode in PDA. Vse skupaj smo mešali, saj se ne sme prijeti in prismoditi, dokler ni hranilni medij zopet zavrel. Tako pripravljen hranilni medij smo nalili v epruvete. Pri tem smo si pomagali z pipeto, s katero smo v vsako epruveto odpipetirali 10 mL PDA gojišča. Epruvete smo zavili v aluminijasto folijo in jih postavili v stojalo. Stojala smo zložili v avtoklav (slika 11) in avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121°C oziroma 1,5 bara. Po avtoklaviranju smo epruvete prenesli v laminarij (slika 11). Kasneje smo ponovili test za še nižje koncentracije, zato smo potrebovali še dodatnih 85 epruvet. Stehtali smo 33,15 g suhega hranilnega gojišča in 850 mL destilirane vode, ter ponovno skuhali ter avtoklavirali.



Slika 11: Avtoklav (levo) in Laminarij (desno)

### 3.2.1.2 Priprava vodnih raztopin TBTO

Za presejalni test smo pripravili raztopine TBTO. Presejalnega testa za baker nismo delali, ker je bil že večkrat izveden (Malnarič, 2001; Pohleven in sod., 2001; Humar in sod., 2004) in smo podatke povzeli po teh virih. Seznam končnih koncentracij TBTO-ja je razviden iz preglednice 3.

Preglednica 3: Koncentracija kositra v hranilnem gojišču ter merilnih bučkah in pripadajoče oznake

Oznaka	Končna koncentracija Sn v gojišču [ppm]	Koncentracija Sn v bučki [ppm]
K	0	0
NNNN	2	200
NNN	5	500
NN	10	1000
N	25	2500
S	50	5000
V	100	10000
VV	250	25000

V 10 mL-trske bučke smo zatehtali izračunane količine TBTO-ja ( $C_{24}H_{54}OSn_2$ ) ter prilili destilirano vodo do oznake, jo zaprli z zamaškom in jo dobro pretresli, da se je vsebina premešala.

V vroče, tekoče sterilno hranilno gojišče smo pod sterilnimi pogoji v laminariju z mikropipeto dodali 100  $\mu\text{L}$  raztopine in premešali. Nato smo epruvete zaprli s folijo in jih pustili v laminariju, nagnjene pod kotom 30° (slika 12), da se je hranilno gojišče strdilo.

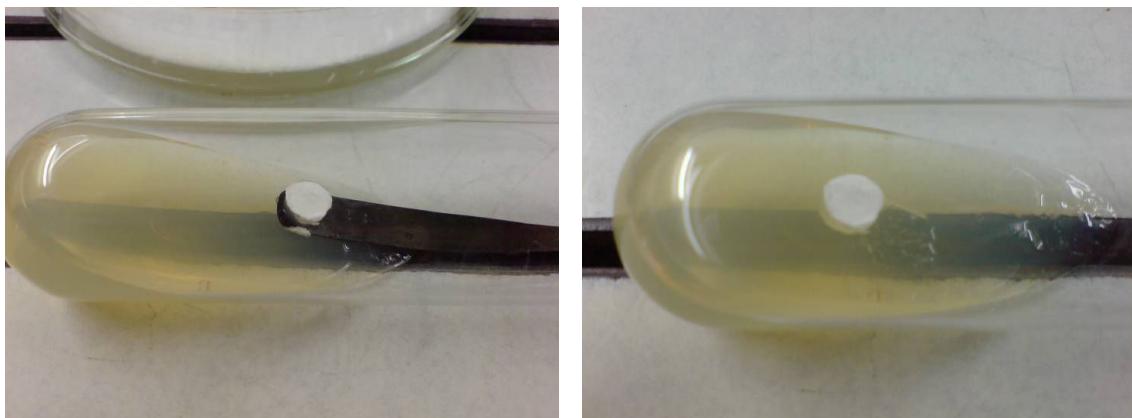


Slika 12: Hlajenje pripravljenega hranilnega gojišča.

### 3.2.1.3 Inokulacija hranilnega gojišča z izbranimi kulturami gliv

V laminarij smo zložili petrijevke s štartnimi kulturami izbranih gliv in epruvete z hranilnim gojiščem. Nato je sledila inokulacija (slika 13) hranilne podlage z izbranimi kulturami lesnih gliv (pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)), ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*), bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*), bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*), navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*)). Iz petrijevke z izhodiščno kulturo smo vzeli košček že zraslega micelija določene glive ter ga s pomočjo špatule sterilno

prenesli na hranično gojišče v epruveti. Epruvete smo zaprli s folijo in jih postavili v stojala in stojala postavili v rastno komoro s temperaturo 25 °C in relativno zračno vlažnost 75 %. Inolukirane epruvete smo v komori inkubirali šest dni.



Slika 13: Inokulacija hraničnega gojišča v epruveti

### 3.2.1.4 Postopek ocenjevanja rezultatov

Odpornost gliv smo določali na podlagi vizualne ocene priraščanja kulture micelija. Izmed petih kontrolnih gliv smo izbrali epruveto s povprečno rastjo, ki nam je služila za primerjavo. Prirast smo ocenili z ocenami od ena do pet. Ocena ena je pomenila, da micelij glive na testnem gojišču prirašča enako kot kontrola. Z oceno pet smo označili popolno inhibicijo rasti (micelij se sploh ni obraščal) (preglednica 4). Ocenjevali smo šesti dan od inokulacije. Končna ocena je povprečje ocen vseh epruvet ene glive iste koncentracije raztopin.

Preglednica 4: Vizualne ocene priraščanja micelija gliv

Ocena priraščanja micelija	Opis
1	raste enako kot kontrola – priraščanje brez zaviranja
2	komaj opazno zaviranje rasti
3	močno zaviranje rasti
4	gliva komaj uspeva
5	popolna zaustavitev rasti - gliva ne raste

## 3.2.2 Izvedba postopka biofiltracije

### 3.2.2.1 Priprava gojišča - substrata

V kad smo dali tri dele bukovih skobljancev, tri dele smrekove žagovine ter polovični del otrobov (10 %) (del je znašal približno 600 g in je bil merjen z merilno posodo). Začetna vlažnost mešanice je bila 7 %. Substratu smo dodali vodo, da smo navlažili in pridobili primerno vlažnost za rast gliv. Sestavine smo dobro premešali in napolnili propilenske vrečke, ki smo jih zaprli s tulcem in vato. Tako pripravljene vreče smo tri ure avtoklavirali (ter 30 minut segrevanje) pri temperaturi 121 °C oziroma tlaku 1,5 bara. Ko se je substrat ohladil smo ga inokulirali z glivami ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*) in bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*), z izjemo kontrole, ki smo jih izbrali na podlagi literaturnih podatkov o presejalnih testih. Inokulirana gojišča in kontrolo smo postavili v rastno

komoro s temperaturo 25 °C in relativno zračno vlažnostjo 75 % za šest tednov (slika 14). Med tem časom, smo večkrat pregnetli vreče, da se je micelij lepo enakomerno razrasel čez ves substrat (slika 15).



Slika 14: Inokulirana gojišča in kontrola v rastni komori.



Slika 15: Gojišče preraslo z micelijem ogljene kroglice (*Hypoxylon fragiforme*) po šestih tednih.

### 3.2.2.2 Priprava raztopin

Za biofiltracijo smo uporabili le bakrove vodne raztopine, kositrove so bile preveč učinkovite in so zavrele rast že v relativno nizkih koncentracijah (1 ppm). Zaradi eksperimentalnih omejitev (meja detekcije) spektrometra XRF, slabe topnosti TBTO vodi, je bila izvedba postopka biofiltracije kositrovih spojin nemogoča.

Za pripravo bakrovih raztopin smo uporabili različne koncentracije bakrovega(II) sulfata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) (modra galica), kot je razvidno iz preglednice 5.

Potrebno količino bakrovega(II) sulfata smo na tehtalni ladjici (aluminijasta folija) zatehtali na elektronski tehtnici in vsakega ločeno vsuli v 1000 mL merilno bučko in razredčili do značke in temeljito premešali.

Preglednica 5: Koncantracije raztopin za biofiltracijo

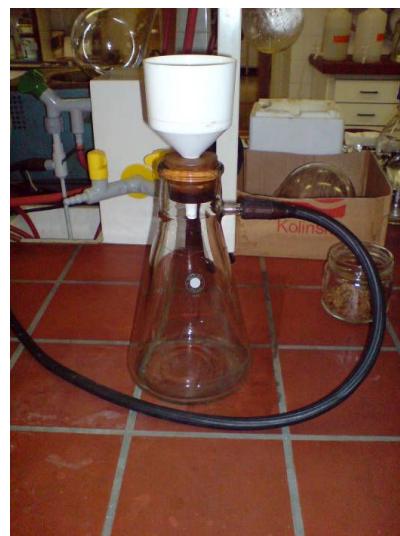
Koncentracija Cu v 1 L vodne raztopine[ppm]	Masa Cu merilni bučki [g/L]	Masa CuSO <sub>4</sub> v merilni bučki [g/L]
100	0,1	0,3929
50	0,05	0,1965
25	0,025	0,0982
10	0,01	0,0393
5	0,005	0,0196

### 3.2.2.3 Izvedba biofiltracije

V 350 mL steklen kozarček (slika 16) smo zatehtali 10 g substrata (vlažen les, vlažen les + micelij, suh les, suh les + micelij). Substrat smo prelili s 100 mL vodne raztopine modre galice različnih koncentracij (preglednica 5) ter pustili namakati različen čas (5 minut, 15 minut, 45 minut, 7 dni, 14 dni). Kozarci so bili med namakanjem zaprti. Po določenem času smo vsebino čaše s pomočjo vodne črpalke prefiltrirali (slika 17) in dobljeno tekočino shranili za nadaljnjo analizo. Substrat, ki je ostal na filtru, smo dodatno izprali s 3 dL destilirane vode. Po končanem filtriranju smo substrat 24 ur sušili pri temperaturi 103 °C (slika 18).



Slika 16: Namakanje substrata v različnih vodnih raztopinah bakrovega sulfata



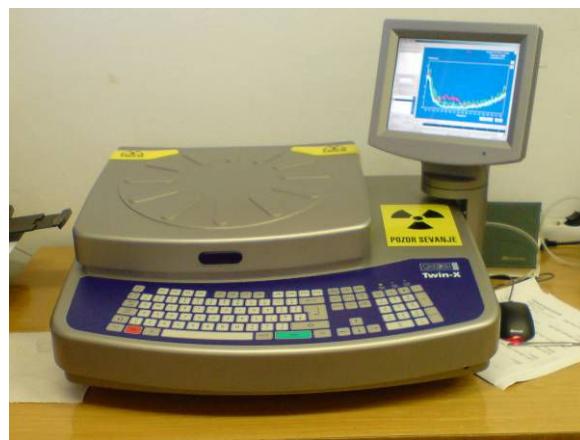
Slika 17: Filtriranje substrata s pomočjo vakuuma



Slika 18: Sušilnik v katerem smo pri 103 °C posušili substrat

### 3.2.3 Rentgenska fluorescenčna analiza (XRF)

Največja prednost rentgenskega fluorescenčnega spektrometra je, da za analizo ne zahteva drage in dolgotrajne priprave vzorcev (slika 19). Dovolj je košček vzorca in že lahko ugotovimo s kakšno sestavo anorganskih snovi je bil les impregniran (Humar, 2007).



Slika 19: Rentgenski fluorescenčni spektrometer (XRF)

Osnova metode XRF temelji na vzbujanju (ionizaciji) atomov (predvsem v K in L orbiti) in nato relaksacija vzbujenega (ioniziranega) atoma. V procesu relaksacije (prehod atoma v osnovno stanje) odda vzbujen atom sprejeto energijo kot fluorescenčno oziroma karakteristično sevanje, kar neposredno služi za določanje kvalitativne in kvantitativne sestave vzorcev (Humar, 2007).

Aparatura XRF je zelo fleksibilna in jo po potrebi lahko uporabljamo za vse vrste materialov (papir, lepilo, usnje, kamnine, biološki vzorci...). Analiziramo lahko tudi biološke vzorce z visoko vsebnostjo vode (micelij glive, hranilna gojišča, rastline, zemlja). S to napravo je možno določiti tudi vsebnost posameznih elementov v tekočinah, kot so na primer zaščitni pripravki za les, odpadne vode, izpirki... Poleg analize zaščitenega lesa je, tehnika XRF primerna tudi za analizo odsluženega lesa, saj lahko hitro in natančno določimo vsebnost anorganskih onesnaževal ter na podlagi teh rezultatov določimo namen uporabe (Humar, 2007).

Pri rentgenski fluorescenci atome vzbujamo s fotoni in razlikujemo po vzbujanju:

- rentgensko fluorescenco z radioizotopskim vzbujanjem (XRF), pri čemer atome vzbujamo z radioaktivnimi izvori kor so na primer  $^{55}\text{Fe}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{241}\text{Am}$  (monokromatsko vzbujanje).
- rentgensko fluorescenco z vzbujanjem z rentgenskimi žarki, ki izhajajo iz rentgenske cevi (polikromatsko vzbujanje (Humar, 2007).

Z metodo lahko določamo vse elemente od Mg (12) do U (92) v prašnatih, trdih in tekočih vzorcih. Koncentracije zaznavnosti za elemente z atomskim številom od 20 do 40 so 3 ppm, za elemente z atomskim številom od 40 do 90 pa 10 ppm. Na splošno smatramo, da je rentgenska fluorescencija primerna za določanje višjih koncentracij (0,01 % – 70 %). Meja zaznavnosti je zelo odvisna tudi od osnovnega elementa (matriksa). V organskih spojinah in luhkih matriksih (npr. aluminiju in lesu) lahko določamo tudi nizke koncentracije elementov, medtem ko je v težjih matriksih (kamen, jeklo) to težje (Humar, 2007).

### 3.2.3.1 Priprava vzorcev

Iz posušenega substrata, ki smo ga pridobili pri biofiltraciji, smo s stiskalnico (slika 20) s pritiskom 12 ton, po 10 minutah stiskanja izdelali tablete za analizo XRF (slika 21).



Slika 20: Stiskalnica za izdelavo tablet za analizo XRF



Slika 21: Sestavni deli modela za izdelavo tablet in primer tableta iz lesa

Tekočine pridobljene pri postopku biofiltracije smo prelili v predhodno pripravljene aluminijaste čaše za analizo XRF (slika 22).



Slika 22: Predhodno pripravljene čaše z raztopino pred analizo XRF

### 3.2.3.2 Postopek analize XRF

V rentgenskem fluorescenčnem spektrometru (XRF) smo vzporedno določali vsebnost bakra desetim vzorcem (tableti ali tekočini), ki smo jih vstavili v napravo (slika 23). Stisnjene lesene vzorce in predhodno pripravljene kozarčke s tekočino smo postavili vsakega v svojo posodico. Na dno posodice smo napeli plastično folijo (Mylar, Oxford Instruments). Na ekranu (slika 24) smo oštrevilčili vzorce in izbrali želen postopek analize, v našem primeru analizo Cu v lesu 1 - 5000 ppm za stisnjen les, ter Cu v vodi 5 - 800 ppm za odpadno vodo. Po končani analizi smo dobili koncentracijo bakra v lesu ali v odpadni vodi izraženo v ppm ( $1 \text{ ppm} = 10^{-4} \%$ ).



Slika 23: Notranjost spektrometra XRF



Slika 24: Programski vmesnik spektrometra XRF

### 3.2.4 Merjenje pH vrednosti

Zanimalo nas je kakšna je razlika v pH vrednosti pred in po filtraciji, saj so mikroorganizmi v bioloških čistilnih napravah občutljivi tudi na preveč kislo ali preveč bazično okolje.

Za merjenje pH smo uporabili pH meter Metrom 827 pH LAB (slika 25). Pred merjenjem smo pH meter umerili s puferoma vrednosti pH 4 in pH 7 po navodilih proizvajalca.



Slika 25: pH meter Metrom 827

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 PRESEJALNI TEST

#### 4.1.1 Vpliv organo kositrovih spojin na rast lesnih gliv

S presejalnim testom smo določili vpliv TBTO v hranilnem gojišču na rast micelija glive. Pri različnih koncentracijah kositra so izolati gliv različno priraščali. Vizualno ocenjevanje smo ocenili šesti dan po inokulaciji gliv na hranilno gojišče.

Najprej smo izvedli presejalni test na hranilnih gojiščih, ki so vsebovali 10, 25, 50, 100 in 250 ppm kositra. Po šestih dneh smo ugotovili, da so vse glive pri vseh koncentracijah močno ali povsem zavrte. Le pri 10 ppm kositra v hranilnem gojišču je bilo opaženo da nekatere glive komaj uspevajo in sicer pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*) (slika 26 in 27), ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*) (slika 28) ter navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*) (slika 31 in 32). Medtem ko je bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) (slika 29) še vedno močno zavrt ter je bila opažena rast samo na ceipišču. Pri beli hišni gobi (*Antrodia vaillantii*) (slika 30) pa je bila rast močno zavrta tudi pri 10 ppm kositra v hranilnem gojišču. Zato smo se odločili test ponoviti še pri nižjih koncentracijah (2 ppm in 5 ppm). Pri nižjih koncentracijah kositrovih spojin v hranilnem gojišču, smo ugotovili, da tudi pri tako nizki koncentraciji uspeva le ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*), ostale glive pa so bile močno zavrte (preglednica 6).

Preglednica 6: Vizualne ocene priraščanja gliv v odvisnosti od koncentracije TBTO v hranilnem gojišču

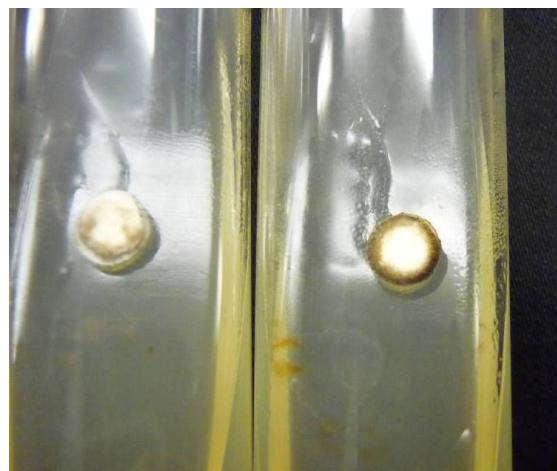
Gliva	Oznaka	Koncentracija kositra [ppm]							
		0	2	5	10	25	50	100	250
		kontrola	NNNN	NNN	NN	N	S	V	VV
Vizualna ocena priraščanja									
pisana ploskocevka	Tv	1	okuženo	okuženo	4	-5	-5	5	5
ogljena kroglica	Hf	1	3	4	4	-5	-5	5	5
bukov ostrigar	Plo <sub>5</sub>	1	4,5	5	-5	5	5	5	5
bela hišna goba	Pv <sub>2</sub>	1	4,5	-5	4,5	4,5	5	5	5
navadna tramovka	Gt <sub>2</sub>	1	4,5	5	4	-5	-5	-5	5

Opombe: Dodali smo novo oceno -5, ki opisuje rast samo na ceipišču, ne pa tudi na gojišču (kositer verjetno ni difundiral po ceipišču navzgor proti glivi).

Zanimivo je tudi rjavo obarvanje hranilnega gojišča (slika 32) pri gojiščih z dodanim kositrom po kontaktu z glivo navadno tramovko (*Gloeophyllum trabeum*). Razlogov za to obarvanje ne znamo razložiti. Pri pisani ploskocevki (*Trametes versicolor*) je gliva na gojišču s kositrom ravno tako močno zavrt, kljub temu pa je rob ceipišča pri najvišji koncentraciji kositra ožgan (slika 27).



Slika 26: Rast pisane ploskocevke (*Trametes versicolor*) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin



Slika 27: Rast pisane ploskocevke (*Trametes versicolor*) na hranilnem gojišču pri koncentraciji 100 ppm (levo) in 250 ppm kositra (desno)



Slika 28: Rast ogljene kroglice (*Hypoxyton fragiforme*) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovinih spojin



Slika 29: Rast bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovinih spojin



Slika 30: Rast bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin



Slika 31: Rast navadne tramovke (*Gloeophyllum trabeum*) na hranilnem mediju brez dodanega kositra (kontrola) (K=0 ppm) in hranilnem mediju z NN=10 ppm, N=25 ppm, S=50 ppm, V=100 ppm, VV=250 ppm kositra v obliki organo kositrovih spojin



Slika 32: Obarvanje hranilnega gojišča pri navadni tramovki (*Gloeophyllum trabeum*) brez kositra (leva epruveta) in s 250 ppm kositra (desna epruveta)

Ugotovili smo, da kositer že pri zelo nizkih koncentracijah močno ali popolnoma zavre rast vseh gliv, ki smo jih uporabili v preizkušu. Zato ni primeren za izvajanje postopkov biofiltracije saj glive ne bi bile sposobne prerasti substrata s kositrom in zato niso primerne za eksperimentalno delo v našem laboratoriju, saj jih s spektrometrom XRF ne moremo zaznati. Poleg tega so se med izvajanjem presejalnega testa pojavile težave, s topnostjo kositra v vodi, čiščenjem onesnažene steklovine, varnim odstranjevanjem odpadne tekočine... Zaradi omenjenih razlogov, smo se odločili, da bomo preizkuse za biofilter nadaljevali le z bakrom in bakrovimi spojinami.

#### **4.1.2 Vpliv bakrovih spojin na rast lesnih gliv**

Presejalnega testa za bakrove spojine nismo izvedli, ker je bil že velikokrat izveden. Potrebne podatke smo povzeli iz obstoječih raziskav (Malnarič, 2001; Pohleven in sod, 2001; Humar in sod., 2004).

#### **4.2 UČINKOVITOST BIOFILTRACIJE BAKROVIH PRIPRAVKOV**

Biofiltracijo bakrovih spojin smo izvedli na substratu preraščenem z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*), ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*) in plesnijo. Za belo hišno gobo je značilna velika toleranca na bakrove spojine, kar se je potrdilo v preteklem eksperimentalnem delu (Malnarič, 2001; Pohleven in sod, 2001; Humar in sod., 2004). Ogljeno kroglico smo vključili, ker se je v preteklosti izkazala za izredno zanimivo glivo, ki je sposobna razgradnje substratov, ki jih ostale glive ne razkrajajo (Humar in sod., 2008).

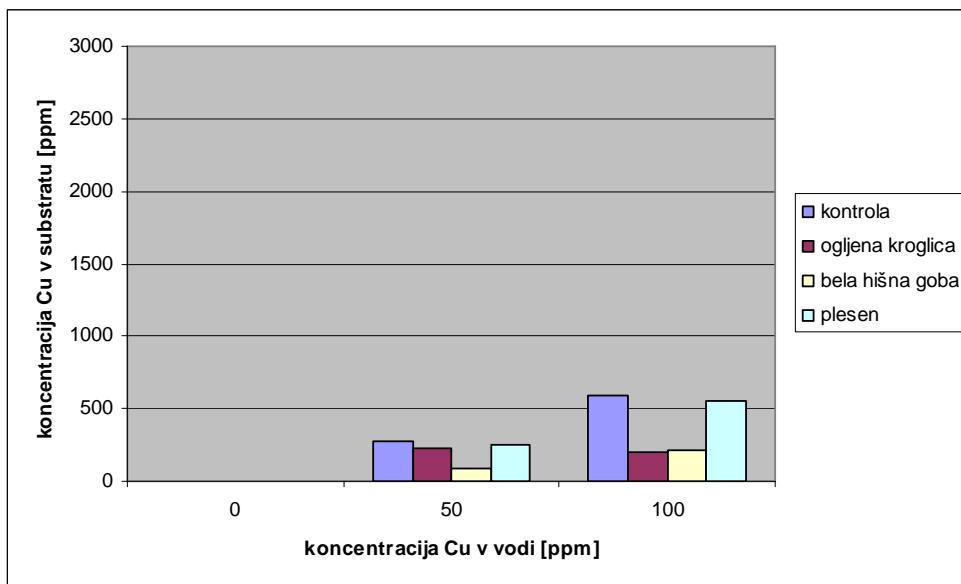
Količino vezanega bakra in preostanek bakra v vodi smo določili z rentgensko fluorescenčno analizo (XRF), ki smo jo opisali v poglavju 3.2.3. Rezultate smo prikazali v dveh oblikah: v odvisnosti od časa, ter v odvisnosti od uporabljenih gliv za predhodno obdelavo substrata.

#### 4.2.1 Vpliv časa namakanja na učinkovitost biofiltracije

Pri biofiltraciji se je kontrolni substrat, ki ni bil preraščen z glivami, večini primerov obnesel bolje od substrata, ki je bil pred biofiltracijo preraščen z micelijem ogljene kroglice (*Hypoxyton fragiforme*), oziroma bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*). Po naključju, ker se je ena od vrečk s kontrolnim substratom okužila s plesnijo, smo v eksperiment vključili tudi ta substrat. Izkazalo se je, da se na substrat okužen s plesnijo, veže precej več bakra kot na tistega ki ga je prerasla ogljena kroglica (*Hypoxyton fragiforme*) oziroma bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*).

##### 4.2.1.1 Učinkovitost biofiltracije po petih minutah namakanja

Rezultati kratkotrajnega namakanja (5 minut) so pokazali, da se v kontrolo in substrat s plesnijo veže več bakra, kot v substrat okužen z ogljeno kroglico (*Hypoxyton fragiforme*) ter belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*). Substrat preraščen z micelijem bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*) je absorbiral najmanj Cu iz raztopine s 50 ppm Cu. V lesu smo zaznali le 86 ppm bakra (slika 33). Po drugi strani, smo pri kontrolnem substratu, ki smo ga 5 min namakali v vodno raztopino s 50 ppm Cu, določili kar 282 ppm bakra. Po 5 minutah namakanja substrata v vodno raztopino s 100 ppm bakra, sta bili vsebnosti bakra v substratu, preraščenem z belo hišno gobo in ogljeno kroglico, primerljivi. Oba substrata sta absorbirali okoli 200 ppm Cu. Najbolj sta bila učinkovita kontrolni in s plesnijo preraščen substrat. Po 5 minutah namakanja smo v kontrolnem substratu določili kar 596 ppm bakra (slika 33, preglednica 7).



Slika 33: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po petih minutah namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

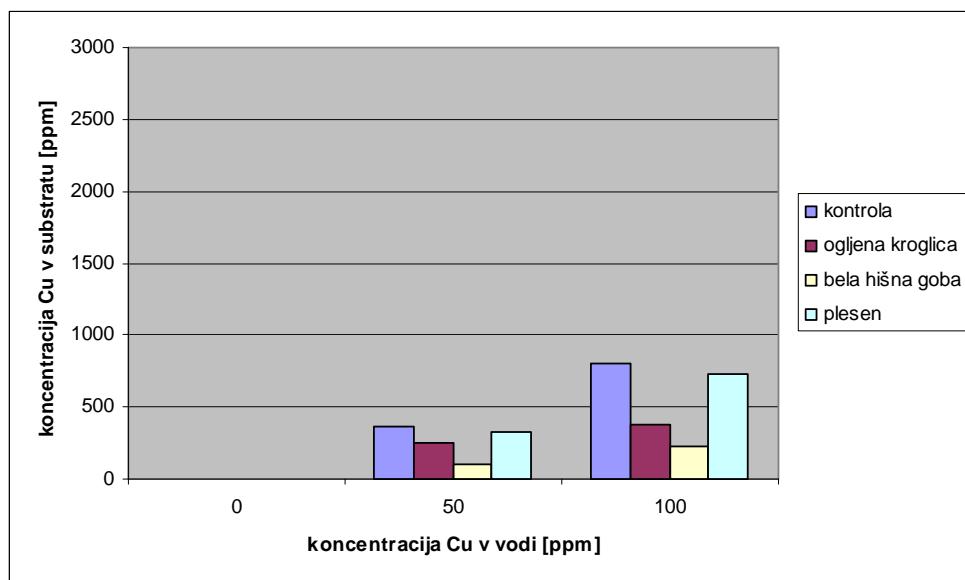
Preglednica 7: Povprečna koncentracija bakra v substratu po petih minutah namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

Gliva, ki je preraščala substrat	Oznaka	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	0*	0*
		50	41	282
		100	86	596
ogljena kroglica	Hf	0	0*	0*
		50	44	223
		100	97	207
bela hišna goba	Pv	0	0*	0*
		50	51	86
		100	99	218
plesen	p	0	0*	0*
		50	42	256
		100	81	549

\* pod mejo detekcije.

#### 4.2.1.2 Učinkovitost biofiltracije po petnajstih minutah namakanja

Rezultati 15 minutnega namakanja so bili podobni kot pri 5 minutnem namakanju, le da je bila koncentracija Cu v substratu nekoliko višja. Ponovno je bil substrat preraščen z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*) najmanj učinkovit, saj smo po 15 min namakanja v raztopini s 100 ppm bakra v substratu zaznali le 231 ppm bakra. Nekoliko višje koncentracije smo določili pri substratu okuženem z ogljeno kroglico (382 ppm bakra) po namakanju v raztopini s 100 ppm Cu. Ponovno pa smo največ Cu določili v kontrolnem substratu, kjer je bilo kar 807 ppm bakra po namakanju v raztopino s 100 ppm bakra (slika 34, preglednica 8).



Slika 34: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po petnajstih minutah namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

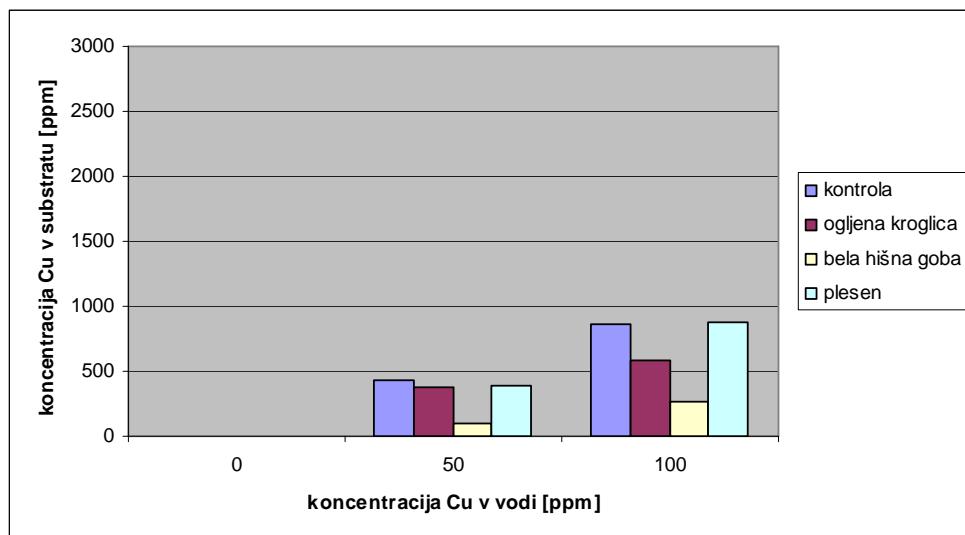
Preglednica 8: Povprečna koncentracija bakra v substratu po petnajstih minutah namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

Gliva, ki je preraščala substrat	Oznaka	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	0*	0*
		50	43	369
		100	77	807
ogljena kroglica	Hf	0	0*	0*
		50	40	256
		100	90	382
bela hišna goba	Pv	0	0*	0*
		50	49	99
		100	99	231
plesen	p	0	0*	0*
		50	39	330
		100	77	731

\* pod mejo detekcije.

#### 4.2.1.3 Učinkovitost biofiltracije po petinštiridesetih minutah namakanja

Tudi po 45 minutnem namakanju različnih substratov v raztopine bakra smo opazili podobne rezultate kot po 5 min in 15 min. Razlikuje se le v tem, da smo po namakanju v raztopino s 100 ppm Cu, v plesnivem substratu določili najvišje vsebnosti Cu. Vsebnost Cu pri plesnivih substratih je tako znašala 880 ppm, pri kontrolnem pa 863 ppm bakra. Pri uporabi plesnivega substrata se je iz vode izločilo tudi največ bakra, iz začetnih 100 ppm, jih je v vodi po biofiltraciji ostalo le še 73 ppm bakra. Najslabše se je ponovno izkazal substrat okužen z belo hišno gobo s komaj 270 ppm Cu po namakanju v vodni raztopini s 100 ppm Cu. Nekoliko učinkovitejši je bil substrat inokuliran z ogljeno kroglico, kjer smo zaznali 588 ppm bakra (slika 35, preglednica 9).



Slika 35: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po petinštiridesetih minutah namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

Preglednica 9: Povprečna koncentracija bakra v substratu po petinštiridesetih minutah namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

Glica, ki je preraščala substrat	Oznaka	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	0*	0*
		50	39	436
		100	74	863
ogljena kroglica	Hf	0	0*	0*
		50	38	381
		100	82	588
bela hišna goba	Pv	0	0*	0*
		50	50	100
		100	98	270
plesen	p	0	0*	0*
		50	36	384
		100	73	880

\* pod mejo detekcije.

#### 4.2.1.4 Učinkovitost biofiltracije po sedmih dneh namakanja

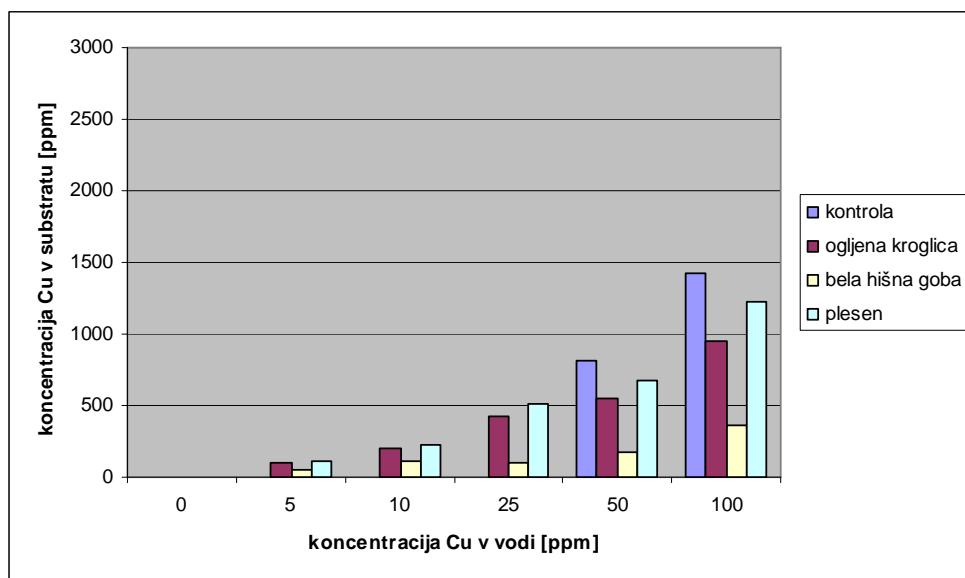
Kratkotrajni eksperimenti so pokazali, da se v tako kratkem obdobju iz vode izloči relativno malo bakrovih učinkovin. Zato smo postopek biofiltracije močno podaljšali na 7 dni oziroma 14 dni. Poleg tega smo v eksperiment vključili še vodne raztopine z nižjo koncentracijo bakra, saj odpadne vode pogosto vsebujejo tudi nižje koncentracije težkih kovin.

Prav tako, smo pri daljših časih namakanja, poleg vlažnega, uporabili tudi suh (posušen) substrat. S tem smo žeeli preveriti, ali mrtev micelij vpliva na vezavo bakra v les. Izkazalo se je, da je posušen substrat, ki je bil okužen z plesnijo, najbolj učinkovit pri vezavi bakra v substratu. S praktičnega stališča bi bilo za biofiltracijo laže uporabiti suh substrat, saj ga laže skladiščimo in ima daljšo življensko dobo od vlažnega.

Po 7 dneh namakanja neposušenega substrata, smo največ bakra določili v kontrolnem substratu (1429 ppm). Po 7 dneh namakanja v vodni raztopini s 100 ppm Cu je v vodi ostalo manj kot polovica (42 ppm) bakra. Po učinkovitosti, sledi kontrolnemu substratu substrat prerasel s plesnijo (1225 ppm) namočen v raztopino s 100 ppm Cu. Substrat, okužen z ogljeno kroglico, je pri začetni koncentraciji 100 ppm bakra navzel 950 ppm bakra. Najmanj bakra smo določili v substratu, ki ga je prerasla bela hišna goba, kjer smo določili le 358 ppm po sedemdnevnu namakanju v raztopini s 100 ppm (slika 36, preglednica 10).

Pri 7 dnevnu biofiltriranju, smo uporabili tudi nižje koncentracije bakra v raztopinah in sicer še vodne raztopine bakra s 5, 10 ter 25 ppm. Tu smo skoraj v vseh primerih opazili, da se je iz vode izločila večina bakra, kar je bil tudi naš namen. Substrata preraščena z ogljeno kroglico in plesnijo sta bila najbolj učinkovita. Koncentracija Cu v vodi je tako iz začetne koncentracije 5 ppm, padla na 1 ppm. Pri začetni koncentraciji 10 ppm in 25 ppm, pa se je kot najučinkovitejši izkazal substrat prerasel s plesnijo, saj smo v tem primeru iz

vode odstranili več kot polovico bakra. Iz izhodiščne koncentracije 25 ppm je po biofiltraciji v vodi ostalo le 8 ppm (preglednica 10).



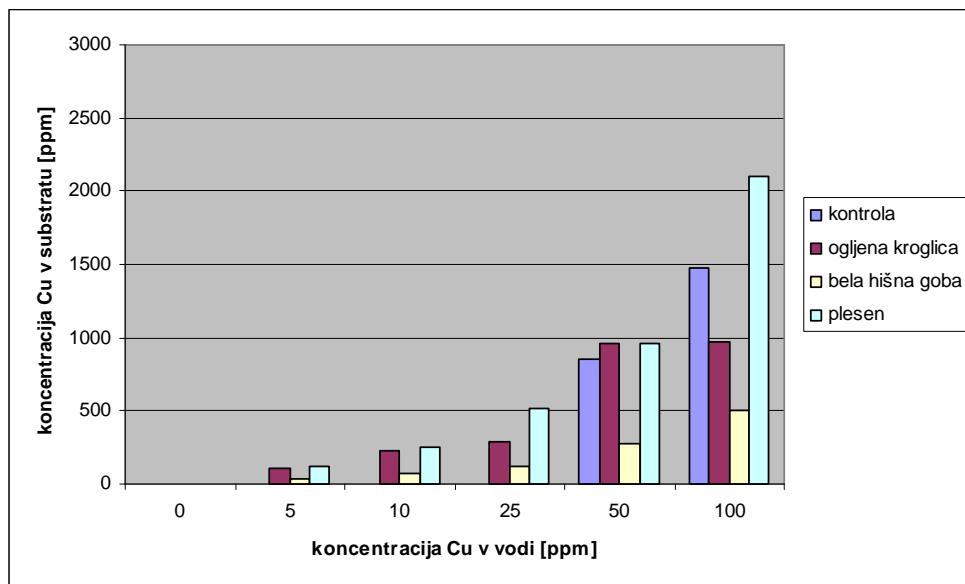
Slika 36: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po sedmih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

Preglednica 10: Povprečna koncentracija bakra v substratu po sedmih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

Gliva, ki je preraščala substrat	Oznaka	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	0*	0*
		50	18	812
		100	42	1429
ogljena kroglica	Hf	0	0*	0*
		5	1	100
		10	5	205
		25	13	421
		50	37	552
		100	79	950
bela hišna goba	Pv	0	0*	0*
		5	3	51
		10	7	112
		25	23	97
		50	45	177
		100	94	358
plesen	p	0	0*	0*
		5	1	110
		10	4	225
		25	8	518
		50	27	675
		100	62	1225

\* pod mejo detekcije.

Pri posušenem substratu, ki smo ga namakali 7 dni, pa je plesniv substrat krepko presegel kontrolnega. V s plesnijo preraščenem substratu smo po 7 dneh namakanja v vodi s 100 ppm Cu določili kar 2099 ppm, v vodi pa je ostalo le 39 ppm bakra. Posušen kontrolni substrat je po 7 dneh namakanja v vodi s 100 ppm Cu absorbiral le malo več kot neposušen in sicer 1481 ppm. Substrat preraščen z ogljeno kroglico je bil najbolj uspešen pri filtraciji vode s 50 ppm Cu, kjer je absorbiral 965 ppm bakra. Substrat preraščen z belo hišno gobo je bil ponovno najmanj učinkovit. Po 7 dneh namakanja v vodi s 100 ppm Cu smo v filtratu določili komaj 501 ppm bakra (slika 37, preglednica 11).



Slika 37: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu okuženem z glivami po sedmih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

Preglednica 11: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu po sedmih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

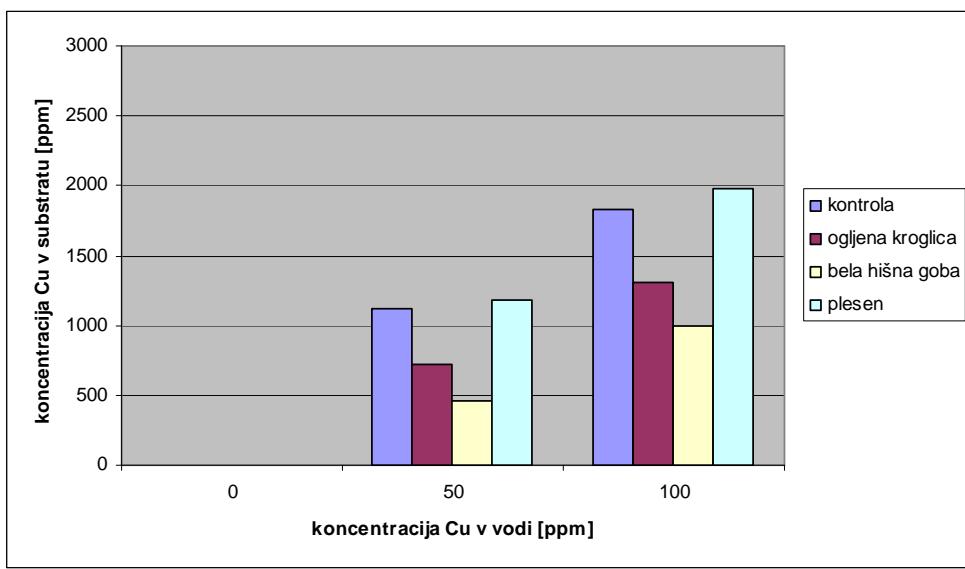
Gliva, ki je preraščala substrat	Oznaka	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	4	0*
		50	17	854
		100	40	1481
ogljena kroglica	Hf	0	0*	0*
		5	0*	106
		10	3	232
		25	13	293
		50	19	965
		100	68	977
bela hišna goba	Pv	0	1	0*
		5	5	34
		10	9	73
		25	23	122
		50	46	282
		100	98	501
plesen	p	0	0*	0*
		5	1	119
		10	0*	251
		25	6	519
		50	22	960
		100	39	2099

\* pod mejo detekcije.

#### 4.2.1.5 Učinkovitost biofiltracije po štirinajstih dneh namakanja

Po 14 dnevni biofiltraciji je prišlo do nekaj več sprememb, kot pri krajsih časih. Posušen substrat, preraščen z ogljeno kroglico, je bil učinkovitejši od suhega kontrolnega. Tudi posušen substrat inokuliran z belo hišno gobo je bil pri biofiltraciji vode s 50 ppm Cu, nekoliko učinkovitejši. Kakorkoli, plesniv substrat je bil v vseh primerih najučinkovitejši. Pričakovano so bili posušeni substrati boljši kot neposušeni (slika 38, preglednica 12).

Sveži plesnivi substrati so bili pri vseh koncentracijah najbolj uspešni, pri filtraciji najvišje koncentracije vodne raztopine Cu (100 ppm) je plesniv substrat absorbiral 1976 ppm bakra, v vodi pa ga je ostalo le 26 ppm. Sledil je kontrolni substrat, kjer smo po 14 dneh namakanja v vodi s 100 ppm Cu, določili 1825 ppm bakra v substratu. Substrat prerasel z ogljeno kroglico je po 14 dneh namakanja v vodi s 100 ppm Cu absorbiral 1306 ppm bakra. Najmanj pa je pri tej koncentraciji Cu v vodi, absorbiral substrat prerasel z belo hišno gobo (999 ppm) (slika 38).



Slika 38: Povprečna koncentracija bakra v substratu okuženem z glivami po štirinajstih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

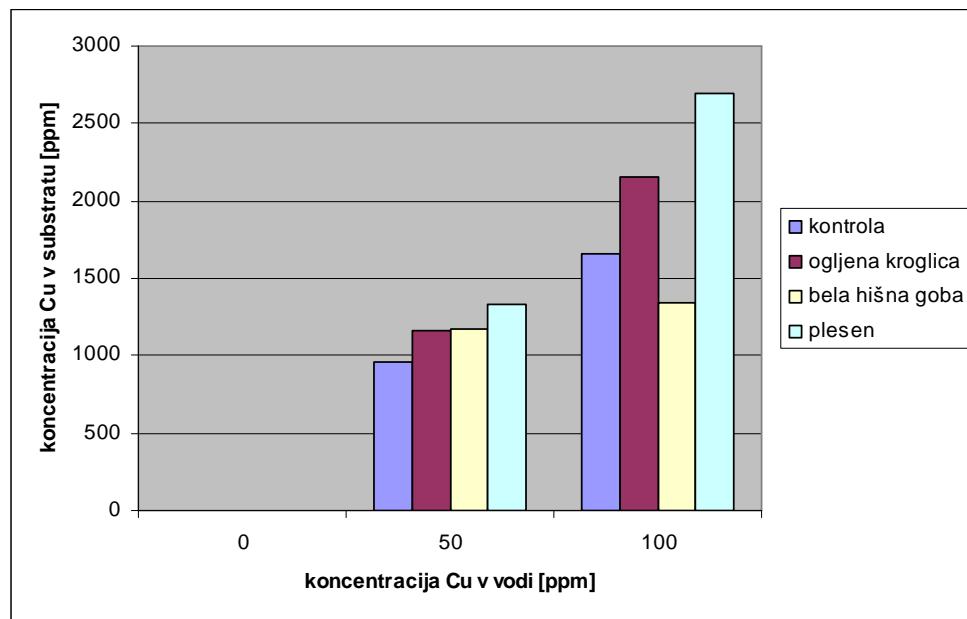
Preglednica 12: Povprečna koncentracija bakra v substratu po štirinajstih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

Gliva, ki je preraščala substrat	Oznaka	Zacetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	1	0*
		50	16	1126
		100	34	1825
ogljena kroglica	Hf	0	1	0*
		50	36	725
		100	69	1306
bela hišna goba	Pv	0	0*	0*
		50	42	458
		100	76	999
plesen	p	0	1	1
		50	12	1182
		100	26	1976

\* pod mejo detekcije.

Posušeni substrat, je po 14 dneh biofiltracije iz vode odstranil največ Cu. Poleg tega pa smo v primerjavi z ostalimi izvedenimi testi opazili največ sprememb. Glede učinkovitosti plesnivega substrata, ni bilo sprememb. Po 14 dneh namakanja v vodi s 100 ppm Cu je bilo v tem substratu kar 2696 ppm bakra. Pri 50 ppm Cu v vodi smo v kontrolnem substratu določili najmanj Cu in sicer le 955 ppm. Bolj učinkoviti so bili celo substrati prerasli z ogljeno kroglico (1164 ppm Cu), belo hišno gobo (1174 ppm Cu) in plesnijo (1332 ppm Cu). Vrstni red učinkovitosti substratov se je nekoliko spremenil pri višji izhodiščni koncentraciji bakra v vodi (100 ppm). Tako smo v substratu, preraslem z belo hišno gobo, določili 1342 ppm Cu, sledi kontrolni substrat s 1659 ppm absorbiranega bakra, substrat okužen z ogljeno kroglico s 2150 ppm Cu, najvišjo vsebnost bakra (2696 ppm) pa smo določili pri plesnivem substratu (preglednica 13, slika 39).

14 dnevna biofiltracija je iz vode izločila največ bakra. Po biofiltraciji vode s 50 ppm Cu s plesnivim substratom, ga je v vodi ostalo le 10 ppm, po filtraciji vode s 100 ppm, pa ga je v vodi ostalo le še 18 ppm.



Slika 39: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu okuženem z glivami po štirinajstih dneh namakanja v vodne raztopine različnih koncentracij

Preglednica 13: Povprečna koncentracija bakra v posušenem substratu po štirinajstih dneh namakanja, ter koncentracija bakra v vodi po namakanju.

Gliva, ki je preraščala substrat	Oznaka	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Povprečje Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečje Cu v substratu [ppm]
kontrola	k	0	5	0*
		50	13	955
		100	35	1659
ogljena kroglica	Hf	0	0*	0*
		50	8	1164
		100	22	2150
bela hišna goba	Pv	0	2	0*
		50	15	1174
		100	65	1342
plesen	p	0	2	0*
		50	10	1332
		100	18	2696

\* pod mejo detekcije.

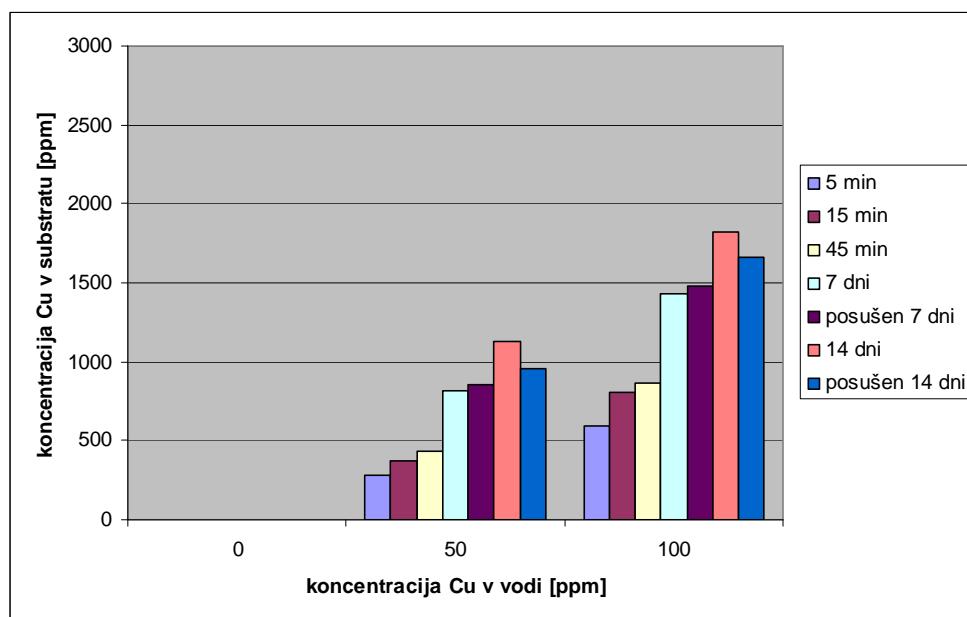
#### 4.2.2 Vpliv preraščanja substrata z glivami na uspeh biofiltracije

V drugem delu smo rezultate biofiltracije povezali po posameznih glivah, da bi tako jasneje prikazali vpliv časa filtracije na uspeh biofiltracije.

##### 4.2.2.1 Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s kontrolnim substratom

Rezultati biofiltracije z neokuženim substratom so pokazali, da se je že v sam substrat vezalo veliko bakra ter ga je v vodi ostalo dosti manj, kot ga je bilo na začetku (slika 40, 41 in 42). To dejstvo dobro izkorisčamo pri impregnaciji lesa z bakrovimi pripravki.

Med drugim nas je zanimal vpliv vlažnosti substrata na absorpcijo Cu. Predvidevali smo, da bo absorpcija bakra pri posušenem substratu učinkovitejša. Proti pričakovanju so rezultati pokazali, da pri neposušenem neokuženem substratu dosežemo večjo učinkovitost biofiltracije, kot pri posušenem. Na primer, pri začetni koncentraciji bakra 100 ppm in času namakanja 14 dni je posušen substrat absorbiral 1659 ppm bakra, neposušen pa kar 1825 ppm bakra. Tudi v vodi se je z daljšanjem časa biofiltracije padala koncentracija Cu. Po 5 minutnem namakanju neposušenega substrata se je iz začetnih 100 ppm koncentracija bakra znižala na 86 ppm. Po tednu dni biofiltriranja pa se je količina bakra v vodi zmanjšala za več kot polovico, na 42 ppm bakra (slika 40, preglednica 14).



Slika 40: Povprečna absorpcija bakra v neinkuliran substrat v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije

Preglednica 14: Povprečna absorpcija bakra v neokužen substrat in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini

Čas biofiltracije	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Koncentracija Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečna koncentracija Cu v substratu [ppm]
5 min	0	0*	0*
	50	41	282
	100	86	596
15 min	0	0*	0*
	50	43	369
	100	77	807
45 min	0	0*	0*
	50	39	436
	100	74	863
7 dni	0	0*	0*
	50	18	812
	100	42	1429
posušen 7 dni	0	4	0*
	50	17	854
	100	40	1481
14 dni	0	1	0*
	50	16	1126
	100	34	1825
posušen 14 dni	0	5	0*
	50	13	955
	100	35	1659

\* pod mejo detekcije.



Slika 41: Namočen neposušen kontrolni substrat (na levi) in namočen posušen kontrolni substrat (na desni)



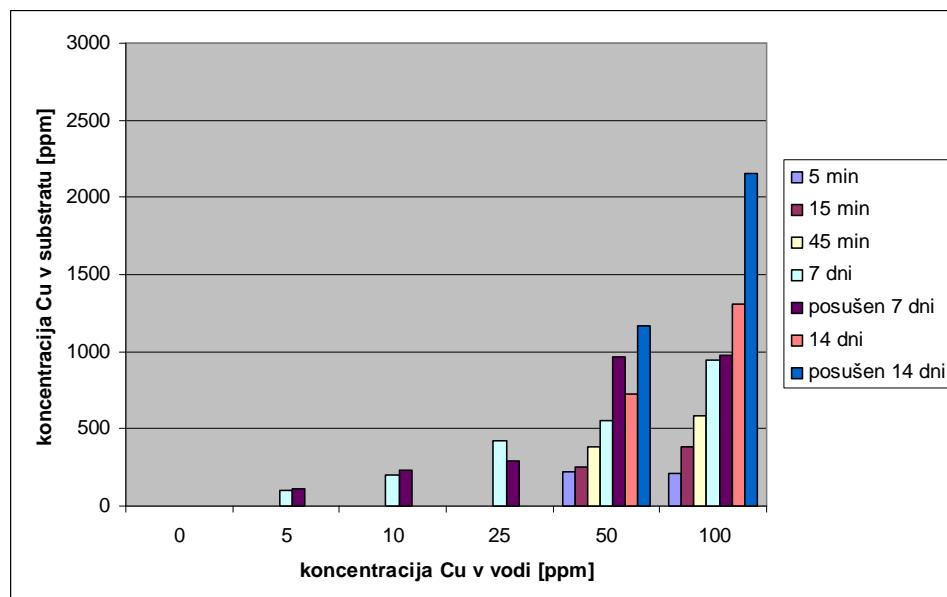
Slika 42: Kontrolni, neokužen substrat stisnjen v tableto pripravljen za meritev XRF

#### 4.2.2.2 Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s substratom okuženim z glivo ogljeno kroglico

Znano je, da glive potrebujejo baker v nizkih koncentracijah za rast. Vemo pa tudi, da so glive bele trohnobe manj tolerantne na baker kot glive rjave trohnobe. Zato nas je presenetilo, da je ogljena kroglica med postopkom biofiltracije, ne glede na koncentracijo, še vedno preraščala (kjer micelij ni bil posušen) (slika 43, 44 in 45).

Pri substratu preraščenem z ogljeno kroglico smo večjo učinkovitost biofiltracije dosegli s posušenim substratom. Neposušen substrat, je po 14 dneh biofiltracije z raztopino s 100 ppm bakra, absorbiral 1306 ppm, posušen pa kar 2150 ppm bakra. Pri tem je po biofiltraciji v vodi ostalo le 22 ppm bakra.

Razlog za boljšo učinkovitost daljšega časa namakanja je bila hidrofobnost micelija. Zaradi vodo-odbojnosti je vodna raztopina težje prehaja v les, zato je biofiltracija verjetno potekala počasneje (slika 43, preglednica 15).

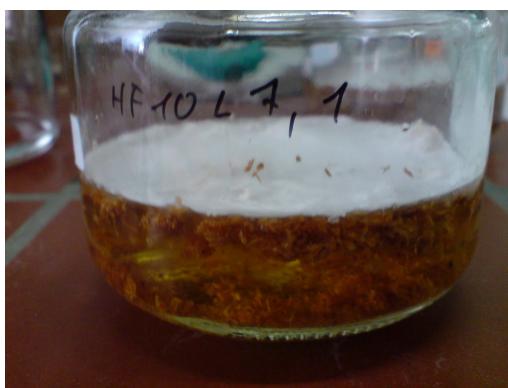


Slika 43: Povprečna absorbcijska kapaciteta bakra v substratu inokuliran z ogljeno kroglico (*Hypoxyylon fragiforme*) v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije

Preglednica 15: Povprečna absorpcija bakra v substrat okužen z ogljeno kroglico (*Hypoxyylon fragiforme*) in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini

Čas biofiltracije	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Koncentracija Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečna koncentracija Cu v substratu [ppm]
5 min	0	0*	0*
	50	44	223
	100	97	207
15 min	0	0*	0*
	50	40	256
	100	90	382
45 min	0	0*	0*
	50	38	381
	100	82	588
7 dni	0	0*	0*
	5	1	100
	10	5	205
	25	13	421
	50	37	552
	100	79	950
posušen 7 dni	0	0*	0*
	5	0*	106
	10	3	232
	25	13	293
	50	19	965
	100	68	977
14 dni	0	1	0*
	50	36	725
	100	69	1306
posušen 14 dni	0	0*	0*
	50	8	1164
	100	22	2150

\* pod mejo detekcije.



Slika 44: Namočen neposušen (na levi) in namočen posušen (na desni) substrat okužen z ogljeno kroglico (*Hypoxyylon fragiforme*)



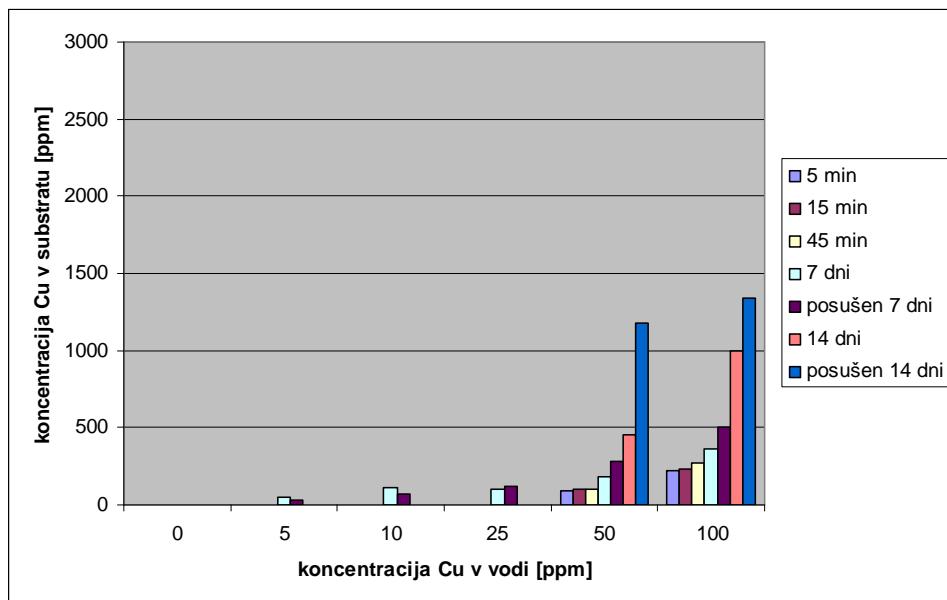
Slika 45: Substrat okužen z ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*) stisnjen v tableto pripravljen za meritev XRF

#### 4.2.2.3 Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s substratom okuženim z glivo belo hišno gobo

Pri substratu preraščenem z belo hišno gobo smo pričakovali boljše rezultate, saj je bilo iz predhodnih objav razbrati, da ta vrsta izloča velike količine oksalne kisline in spada med bolj tolerantne lesne glive (Pohleven in sod., 2001; Humar in sod., 2004). V nasprotju s pričakovanji smo določili drugačne rezultate (slika 46).

Substrat, preraščen z micelijem bele hišne gobe, se je pri vseh časih biofiltracije in pri vseh koncentracijah bakra v filtrirani vodi, obnesel slabše od ostalih substratov. V vodi je ostala večina bakra. Izjema je bil posušen substrat, ki smo ga 14 dni namakali v vodni raztopini s 50 ppm bakra (slika 46, preglednica 16).

Vzrok za ta pojav je lahko izvencelični sluzast material (ECMM), ki dodatno ščiti hife gliv pred strupenimi učinki bakra, tako da zmanjšuje prehod bakrovih ionov v hife (Vesentini in sod., 2007). Nekakšna sluz se je videla v vzorcih neposušenega substrata okuženega z belo hišno gobo (slika 47 in 48).

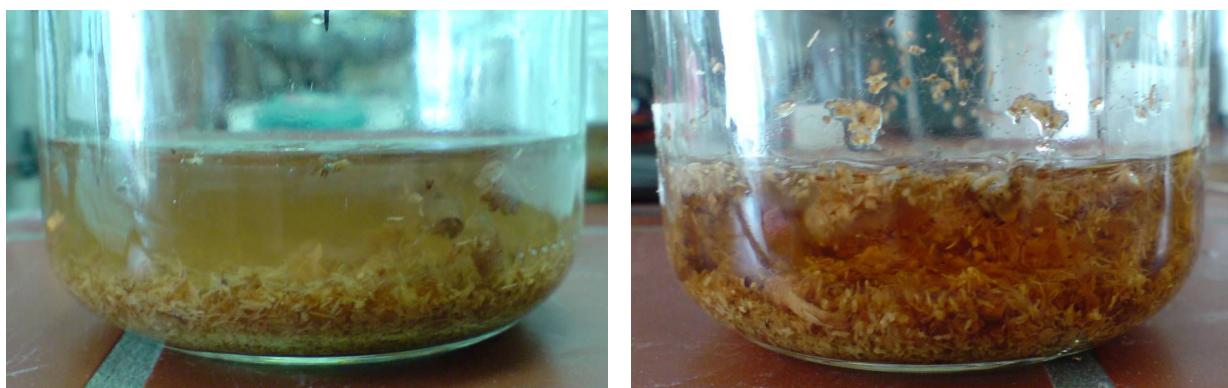


Slika 46: Povprečna absorpcija bakra v substrat inokuliran z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*) v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije

Preglednica 16: Povprečna absorpcija bakra v substrat okužen z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*) in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini

Čas biofiltracije	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Koncentracija Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečna koncentracija Cu v substratu [ppm]
5 min	0	0*	0*
	50	51	86
	100	99	218
15 min	0	0*	0*
	50	49	99
	100	99	231
45 min	0	0*	0*
	50	50	100
	100	98	270
7 dni	0	0*	0*
	5	3	51
	10	7	112
	25	23	97
	50	45	177
	100	94	358
posušen 7 dni	0	1	0*
	5	5	34
	10	9	73
	25	23	122
	50	46	282
	100	98	501
14 dni	0	0*	0*
	50	42	458
	100	76	999
posušen 14 dni	0	2	0*
	50	15	1174
	100	65	1342

\* pod mejo detekcije.



Slika 47: Namočen neposušen (na levi) in namočen posušen (na desni) substrat okužen z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*)

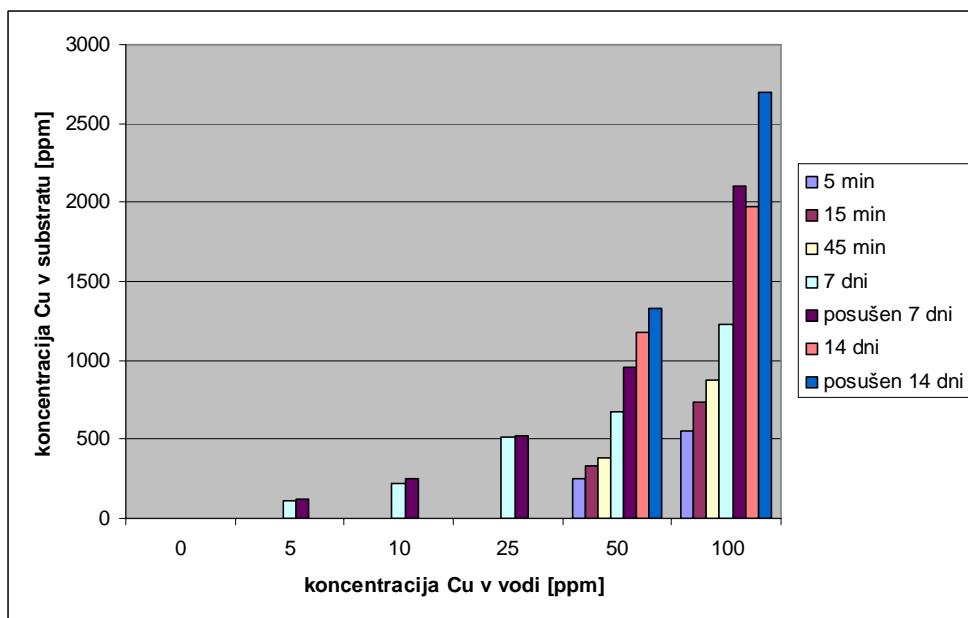


Slika 48: Substrat okužen z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*) stisnjen v tableto pripravljen za meritev XRF

#### 4.2.2.4 Vpliv časa namakanja na uspeh biofiltracije s plesnivim substratom

Substrat okužen s plesnijo prvotno ni bil v planu za biofiltracijo. Dodali smo ga, ker se je ena izmed kontrolnih vrečk substrata okužila s plesnijo. Na podlagi mikroskopske analize sklepamo, da so substrat prerasle glive iz rodu *Penicillium sp.* (slika 50 in 51). Izkazalo se je, da je ta substrat bolj uspešen pri absorpciji bakra, kot substrat preraščen z ogljeno kroglico oziroma belo hišno gobo.

Ugotovili smo, da absorpcija bakra enakomerno narašča z naraščanjem časa biofiltracije (slika 49). Posušen substrat pa se je v vseh primerih obnesel bolje od neposušenega. Po 14 dnevnom namakanju substrata v vodno raztopino s 100 ppm Cu, je neposušen substrat okužen z plesnijo navzel 1976 ppm bakra, posušen pa kar 2696 ppm bakra. Vzporedno pa smo opazili tudi precejšen padec koncentracije bakra v vodi, ki je premo-sorazmeren času namakanja (preglednica 17).

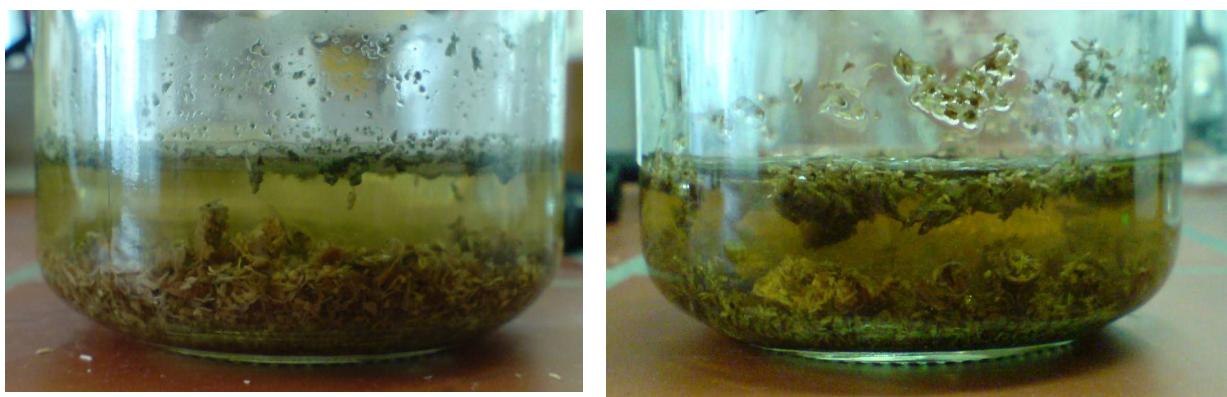


Slika 49: Povprečna absorpcija bakra v plesniv substrat v odvisnosti od koncentracije in časa biofiltracije

Preglednica 17: Povprečna absorpcija bakra v plesniv substrat in koncentracija v vodi po biofiltraciji v odvisnosti od časa, vlažnosti substrata in koncentracije bakra v izhodiščni vodni raztopini

Čas biofiltracije	Začetna koncentracija Cu v vodi [ppm]	Koncentracija Cu v vodi po biofiltraciji [ppm]	Povprečna koncentracija Cu v substratu [ppm]
5 min	0	0*	0*
	50	42	256
	100	81	549
15 min	0	0*	0*
	50	39	330
	100	77	731
45 min	0	0*	0*
	50	36	384
	100	73	880
7 dni	0	0*	0*
	5	1	110
	10	4	225
	25	8	518
	50	27	675
	100	62	1225
posušen 7 dni	0	0*	0*
	5	1	119
	10	0*	251
	25	6	519
	50	22	960
	100	39	2099
14 dni	0	1	1
	50	12	1182
	100	26	1976
posušen 14 dni	0	2	0*
	50	10	1332
	100	18	2696

\* pod mejo detekcije.



Slika 50: Namočen neposušen (na levi) in namočen posušen (na desni) substrat okužen z plesnijo



Slika 51: Plesniv substrat stisnjen v tableto pripravljen za meritev XRF

#### 4.3 SPREMLJANJE pH VREDNOSTI

S pH metrom smo izmerili pH začetnih vodnih raztopin bakra in pH tekočin dobljenih po biofiltraciji. pH vodovodne vode je znašal 7,24, pH destilirane vode, ki smo jo uporabili za pripravo raztopin, pa 5,63. Destilirana voda je bolj kisla kot navadna vodovodna voda, zaradi raztopljenega ogljikovega dioksida. Začetna raztopina s 50 ppm bakra je imela pH 5,03, raztopina z 100 ppm bakra pa 4,95.

Pri vseh koncentracijah in pri vseh substratih, ki smo jih uporabili za biofiltracijo, je bil opažen padec vrednosti pH pri 5 minutnem namakanju. Z daljšanjem časa namakanja pa se je višala tudi pH vrednost tekočin pridobljenih z biofiltracijo (preglednica 18).

Preglednica 18: Vrednosti pH raztopine po biofiltraciji

Gliva	Začetna koncentracija Cu [ppm]	Povprečna vrednost pH						
		5 min	15 min	45 min	7 dni	posušen 7 dni	14 dni	posušen 14 dni
kontrola	0	5,31			5,73	6,09	6,45	6,29
	50	4,96	4,96	5,08	5,62	5,76	5,99	5,78
	100	4,69	4,71	4,78	5,16	5,52	5,71	5,5
ogljena kroglica	0	5,59			4,61	6,13	4,37	6,5
	50	4,93	4,78	5,38	4,42	5,55	4,26	5,95
	100	4,86	4,75	4,76	4,73	4,42	4,45	5,36
bela hišna goba	0	4,5			5,59	4,85	7,15	6,9
	50	4,07	4,12	4,09	4,76	4,57	6,35	6,41
	100	3,85	3,88	3,99	4,44	4,41	6,51	5,82
plesen	0	5,9			6,55	6,14	6,98	6,72
	50	5,13	5,08	5,03	5,56	5,85	6,45	6,49
	100	4,64	4,7	4,9	5,05	6,03	6,05	6,29

## 5 SKLEPI

Kositer že pri zelo nizki koncentracijah močno ali popolnoma zavre rast pisane ploskocevke (*Trametes versicolor*), ogljene kroglice (*Hypoxylon fragiforme*), bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*), bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*) ter navadne tramovke (*Gloeophyllum trabeum*).

Koncentracije bakra v substratu narašča z daljšanjem časa biofiltracije in naraščanjem koncentracije Cu v vodni raztopini.

Najvišjo koncentracijo bakra (2696 ppm) smo določili v posušenem substratu preraščenem s plesnijo, ki smo ga namakali 14 dni v vodni raztopini s 100 ppm Cu. Najnižjo vsebnost Cu (34 ppm) smo določili v posušenem substratu preraščenem z belo hišno gobo, ki smo ga namakali 7 dni v vodni raztopini s 5 ppm bakra.

Substrat razkrojen z glivo rjave trohnobe (*Antrodia vaillantii*) se je pri nizkih koncentracijah in krajših časih namakanja obnesel slabše kot vsi ostali substrati.

Substrat preraščen z ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*), predstavnico belo trohnobe, je bil bolj aktiven kot substrat preraščen z micelijem bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*). V tem substratu smo določili višje koncentracije Cu kot v substratu preraščenem z belo hišno gobo.

Posušen substrat se je na splošno obnesel bistveno bolje kot vlažen. Tako smo v suhem substratu določili bistveno več absorbiranega bakra kot v vlažnem substratu.

Plesniv substrat in kontrolni substrat sta absorbirala bistveno več bakra, kot substrat preraščen z micelijem ogljene kroglice (*Hypoxylon fragiforme*) ter bele hišne gobe (*Antrodia vaillantii*).

Vrednost pH filtrata je najprej padla, nato pa je z daljšanjem časa namakanja začela naraščati. Končne vrednosti so bile še vedno v kislem območju.

## 6 POVZETEK

Kljub številnim varnostnim ukrepom, v industriji pogosto prihaja do namernih in ne slučajnih onesnaževanj. Okolje še posebej ogrožajo težke kovine. Težke kovine, ki zaidejo v vodni sistem, so strupene tako za vodne organizme, pogosto pa zmanjšajo tudi učinkovitost biološke čistilne naprave. Bakrove in kositrove spojine so še posebej nevarne za te čistilne naprave. V diplomski nalogi smo raziskali možnost, da bi kot biofilter ali absorbent uporabili les, ki so ga prerasle lesne glive.

Cilji diplomske naloge so bili določiti vpliv kositrovih spojin na rast izbranih gliv, ugotoviti vpliv glivnega razkroja na absorpcijo bakrovih učinkovin na delno razkrojen les, ter spremljati vpliv časa namakanja in koncentracije bakrovih učinkovin na absorpcijo le teh v okuženo in neokuženo lesno maso.

Za preizkus toksičnosti kositra, ki smo ga izvedli s presejalnim testom, smo uporabili glive bele in rjave trohnobe. Predstavnice bele trohnobe so bile: pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*), ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*) ter bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). Predstavnici rjave trohnobe pa: bela hišna goba (*Antrodia vaillantii*) in navadna tramovka (*Gloeophyllum trabeum*).

Presejalnega testa za bakrove spojine nismo izvajali, ker je bil test že velikokrat izveden in so bili rezultati navedeni v različnih literaturah.

Kositer je že pri zelo nizkih koncentracijah močno ali popolnoma zavrl rast vseh gliv, na katerih smo preizkus izvedli. Ker pa se kositer zelo slabo topi v vodi, smo se odločili nadaljnje preizkuse nadaljevati z bakrom in bakrovimi spojinami.

Za biofiltracijo smo uporabili substrat iz mešanice bukovega in smrekovega lesa ter pšeničnih otrobov, ki smo ga inokulirali z ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*) ter belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*). Uporabili pa smo tudi plesen, saj se je ena izmed kontrol okužila. Substrat smo nato prelili z različnimi koncentracijami bakra (0, 5, 10, 25, 50 in 100 ppm), ter ga pustili namakati različno dolgo (5, 15 in 45 minut ter 7 in 14 dni). Pri 7 dnevnem in 14 dnevnem namakanju pa smo naredili preizkus še z posušenim substratom. Količino navzetega bakra v substratu ter preostanek bakra v vodi pa smo nato izmerili s pomočjo rentgenske fluorescenčne analize (XRF).

Po obdelavi rezultatov smo ovrgli prvo hipotezo, s katero smo pričakovali, da bo les razkrojen z glivami absorbiral višje koncentracije bakrovih učinkovin kot kontrolni, glivam neizpostavljen les. Pri krajših časih namakanja je bil kontrolni substrat precej bolj dovezten za absorpcijo bakra, kot z glivami preraščen substrat. Presenetil pa je substrat preraščen z glivami plesnivkami, ki se je po daljšem namakanju izkazal kot najbolj učinkovit. Najmanj učinkovit pa je bil substrat, preraščen z belo hišno gobo (*Antrodia vaillantii*).

## 7 VIRI

1. Albert L., Nemeth I., Halasz G., Koloszar J., Varga S. Z., Takacs L. 1999. Radial variation of pH and buffer capacity in the red-heartwooded beach (*Fagus sylvatica* L.) wood. Holz als Roh- und Werkstoff, 57, 2: 75-76
2. Ashida J. 1965. Adaptation of fungi to metal toxicants. Annual Review of Phytopathology: 153-174
3. Biocidal Products Directive (98/8/EC). 1998. Official Journal of the European Communities L 123: 1-63
4. Brown A. 2002. Biological control of decay fungi in seasoning utility poles. COST E22. <http://www.bfafh.de/cost22.htm>
5. Bruce A., King B., Highley T. L. 1991. Decay resistance of wood removed from poles biologically treated with *Trichoderma*. Holzforschung, 45: 307-311
6. Carlile M. J., Watkinson S. C. 1994. The Fungi. London, Academic press limited: 482 str.
7. Collett O. 1992. Comparative tolerance of the brown-rot fungus *Antrodia vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv. Isolates to Copper. Holzforschung, 46, 293-298.
8. COM-teh: Biološko čiščenje. 2008. <http://www.comteh.si/default.aspx?ID=714> (28. april 2010)
9. Connell M. 2004. Issues facing preservative suppliers in changing market for treated wood. Bruselj, COST E22: 8 str.
10. Cooney J. J., De Rome L., Laurence O. S., Gadd G. M. 1989. Effects of organotins and organoleds on yeasts. New Phytologist, 61, 2: 214-237
11. Cooper P. A. 1998. Diffusion of copper in wood cell walls following vacuum treatment. Wood and fiber Science, 30, 4: 382-395
12. Da Costa E. W. B. 1959. Abnormal resistance of *Poria vaillantii* (D.C. ex Fr.) Cke. strains to copper – chrome – arsenate wood preservatives. Nature, 183, 7: 910-911
13. Dagarin F., Petrič M., Pohleven F., Šentjurc M. 1996. IRG/WP 96-30110: ERP investigations of interactions between ammoniacal Cu(II) octanoate and wood. V: Section 3. Wood protecting chemicals. 27th Annual Meeting, Guadeloupe, 19-24 May 1996. Stockholm, IRG Secretariat: 11 str.
14. Denim pine. 2004. <http://www.denimpine.ca> (9. junij 2010)
15. Discover Life. 1995. <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Trametes+versicolor> (6. maj 2010)
16. Farmacevtska kemija-1. 2009. (6. okt. 2009) <http://www.scribd.com/doc/16307054/FARMACEUTSKA-KEMIJA-1> (24. maj 2010)
17. Gadd G. M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist, 64, 2: 25-60
18. Graf E. 2001. Biologische und biotechnologische Verfahren gegen holzbewohnende Pilze – eine Übersicht. Holz Roh Werkst 59: 356-362
19. Greco M. A., Hrab D. I., Magner W., Kosman D. J. 1990. Cu, Zn super oksid dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 37, 5: 317-325
20. Gupta U. 1979. Copper in the environment. Part 1. New York, John Wiley & Sons: 215 str.

21. Hartley D., Kidd H. 1987. The agrochemicals handbook. 2nd edition. Nottingham, The Royal Society of Chemistry: A144/Aug 87-A488/Aug 87
22. Hirt R. R. 1949. An isolate of *Poria xanta* on media containing copper. *Phytopathologyst*, 39, 1: 31-36
23. Holz-schimmel. 2005. <http://www.holz-schimmel.de/antrodia.html> (6. maj 2010)
24. Horsfall J. G. 1956. Principles of fungal actions. Waltham Massachusetts, Chronica Botanica Co.: 279 str.
25. Hughes A. S. 1999. Studies on the fixation mechanisms, distribution and biological performance of copper based timber preservatives. Ph. D. thesis. London, Imperial College of Science, Technology and Medicine: 313 str.
26. Humar M. 2002. Interakcija bakrovih zaščitnih pripravkov z lesom in lesnimi glivami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za lesarstvo, 2002: 149 str.
27. Humar M. 2004. Zaščita lesa danes – jutri. *Les*, 56, 6: 184-188
28. Humar M. 2006. Izpiranje baker-etanolaminskih pripravkov iz lesa. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 80: 111-118
29. Humar M. 2007. Rentgenski fluorescenčni spektrometer (XRF) - nova raziskovalna oprema na Oddelku za lesarstvo BF. *Les*, 59, 9-10: 261-262
30. Humar M. 2008a. Bela hišna goba. *Les*, 60, 2: 77
31. Humar M. 2008b. Bukov ostrigar - užitna goba, ki jo lahko gojimo tudi doma. *Les*, 60, 9: 353
32. Humar M. 2008c. Tramovka. *Les*, 60, 4:159
33. Humar M. 2009. Ogljena kroglica ali jagodasti skorjeder. *Les*, 61, 9-10: 429
34. Humar M., Pohleven F. 2003. Razstrupljanje odpadnega s CCA ali CCB pripravki zaščitenega lesa z lesnimi glivami. *Les*, 55: 89-94
35. Humar M., Pohleven F. 2004. Fungicidne lastnosti 50 let starega odpadnega zaščitenega lesa. *Les*, 56, 10: 317-320
36. Humar M., Pohleven F. 2005a. Bakrovi pripravki in zaščita lesa. *Les*, 57, 3: 57-62
37. Humar M., Pohleven F. 2005b. Biotehnologija v lesarstvu. *Les*, 57, 11: 316-321
38. Humar M., Pohleven F., Šentjurc M. 2003. Performance of Waterborne Cu(II) Octanoate/Etolamine Wood Preservatives. *Holzforschung*, 57, 2: 127-134
39. Humar M., Pohleven F., Amartey S. A. 2004. Influence of boron in CCB formulation on growth and decay capabilities of copper tolerant fungi. *Holz Roh-Werkst*, 62, 3: 177-180
40. Humar M., Kalan P., Šentjurc M., Pohleven F. 2005. Influence of carboxylic acids on fixation of copper in wood impregnated with copper amine based preservatives. *Wood science and technology* 39: 685-693
41. Humar M., Žlindra D., Pohleven F. 2006. Influence of water properties on leaching of copper-based preservatives from treated wood. *Wood resarch*, 51: 69-79
42. Humar M., Žlindra D., Pohleven F. 2007. Influence of wood species, treatment method and biocides concentration on leaching of copper-ethanolamine preservatives. *Building and environment*, 42: 578-583
43. Humar M., Fabčič B., Zupančič M., Pohleven F., Oven P. 2008. Influence of xylem growth ring width and wood density on durability of oak heartwood. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 62, 4: 368-371

44. Humphries S.N., Bruce A., Wheatley R.E. 2002. The effect of *Trichoderma volatiles* on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. FEMS Microbiol Lett 210: 215-219
45. Husman T. M. 2004. Clusters of autoimmune diseases in microbial exposure in moisture damaged buildings. Journal of Allergy and Clinical Immunology: 113-59
46. Hüttermann A., Mai C., Kharazipour A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. Appl Microbiol Biotechnol, 55: 387-394
47. Incineration of Waste Directive (2000/76/EC). 2000. Official Journal of the European Communities L 332, 91-112
48. Jellison J., Connolly J., Goodell B., Doyle B., Illman B., Fekete F., Ostrfsky A. 1997. The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, 39, 3: 165-179
49. Jiang X., Ruddick J. N. R. 1999. A spectroscopic investigation of copper ethylendiamine fixation in wood. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRG/WP 99-20160: 13 str.
50. Jin L., Nicholas D. D., Schultz T. P. 1991. Wood laminates glued by enzymatic oxidation of brownrotted lignin. Holzforschung, 45: 467-468
51. Kervina-Hamović L. 1990. Zaščita lesa. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za lesarstvo: 126 str.
52. Körner I., Kühne G., Pecina H. 2001. Unsterile Fermentation von Hackschnitzelneine Holzbehandlungsmethode für die Faserplattenherstellung. Holz Roh Werkst, 59: 334-341
53. Landfield Directive (99/31/EC). 1999. Official Journal of the European Communities L 182, 1-19
54. Le Bayon I., Ansard D., Brunet C., Girardi S., Paulmier I. 2000. Biocontrol of *Reticulitermes santonensis* by entomopathogenic fungi-improvement of the contamination process. International Research Group on Wood Preservation (IRG/WP 00-10359). Stockholm
55. Lee D. H., Takahashi M., Tsunoda K. 1992. Fungal detoxification of organoiodine wood preservatives. Part 1. Holzforschung, 46: 81-86
56. Lewis R. J. 1992. Sax's dangerous properties of industrial materials. Vol. 1, Vol. 2, Vol. 3. 8th edition. New York, Van Nostrand Reinhold: 4339 str.
57. Lukens R. J. 1971. Chemistry of fungicidal action. London, Chapman and Hall: 185 str.
58. Mai C., Kües U., Militz H. 2004. Biotechnology in the wood industry. Appl Microbiol Biotechnol, 63: 477-494
59. Malnarič A. 2001. Ugotavljanje tolerantnosti nekaterih sevov gliv iz rodu *Antrodia* na bakrove spojine. Visokošolska diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 60 str.
60. Messner K., Böhmer S. 1998. Evaluation of fungal remediation of creosote treated wood. International Research Group on Wood Preservation (IRG/WP 98-50101/26). Stockholm
61. Messner K., Fackler K., Srebotnik E., Hinterstoisser B., Steinwender M. 2002. Biotechnological wood modification. V: Proceedings of the international symposium on wood based materials, part 2. Vienna University. Vienna, 45-59
62. Merkač J. 2007. Določanje vsebnosti bakra v hrnilnem mediju in miceliju lesnih gliv z EPR spektroskopijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 61 str.

63. Mycotopia. 2006. (24. mar. 2006)  
<http://forums.mycotopia.net/wild-mushrooming-field-forest/10062-mushroom-pix-edibles.html> (6. maj 2010)
64. Nevarne snovi. 2010. Wikipedia. (8. april 2010)  
[http://sl.wikipedia.org/wiki/Nevarne\\_snovi](http://sl.wikipedia.org/wiki/Nevarne_snovi) (10. maj 2010)
65. Northern caucus. 2005.  
<http://www.northerncaucus.bc.ca/2160/2244> (9. junij 2010)
66. Pečenko G. 1987. Zaščita lesa v praksi. Ljubljana, Zveza društev inženirjev in tehnikov gozdarstva in lesarstva Slovenije: 221 str.
67. Petrič M., Kričej B., Humar M., Pavlič M., Tomažič M. 2004. Patination of cherry wood and spruce wood with ethanolamine and surface finishes. Surf. coat. int., Part B, Coat. Trans., 87: 149-156
68. Pezdirc N. 2005. Vpliv zgradbe policikličnih aromatskih ogljikovodikov in polikloriranih fenolov na rast glive *Hypoxyylon fragiforme*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 90 str.
69. Pipuš G. 2007. Predstavitev tehnologije biofiltracije.  
(<http://www.sdzvdrustvo.si/si/VD%20Referati/Referati/06%20Pipus%20Goran.pdf>) (17. marec 2010)
70. Pohleven F. 1998. The current status of use of wood preservatives in some European countries-summary of the answers to the questionnaire-the last correction in February 1998. Bruselj, COST E2: 2 str.
71. Pohleven F. 2008. Pisana ploskocevka. Les, 60, 3: 115
72. Pohleven F., Šentjurc M., Dagarin F. 1994. Investigation of ammonical copper(II) octanoate in aqueous solutions and its determination in impregnated wood. Holzforschung, 48, 5: 371-374
73. Pohleven F., Breznikar Š., Kalan P., Petrič M. 1999. Determination of absorption, accumulation and transport of copper in mycelium of some wood decay fungi. The International Research Group on Wood Preservation: IRG/WP 99-10323: 9 str
74. Pohleven F., Malnarič A., Humar M., Tavzes Č. 2001. Copper tolerance of various *Antrodia vaillantii* isolates. V: International Research Group on Wood Preservation. IGR Documents, Stockholm. IGR Secretariat, IGR/WP 01-10406. pdf (8 str.).
75. Pravilnik o odlaganju odpadkov. 2000. Uradni list RS. 5/2000, 511-530
76. Preston A. 2000. Trends of today that will influence the industry tomorrow. Forest product journal, 50, 9: 12-19
77. Raspor P. 1996. Biotehnologija. Osnovna znanja. Ljubljana. BIA d.o.o.: 801 str.
78. Richardson B. A. 1993. Wood Preservation. Second edition. London, Glasgow, E&FN Spon, London: 226 str.
79. Richardson H. W. 1997. Handbook of copper compounds and applications. New York, M. Dekker: 93-122
80. Rodney C., De Groot R., Woodward B. 1998. *Wolpiforia cocos* – A potential agent for composting or bioprocessing Douglas – fir wood treated with copper – based preservatives. Material und organismen, 32, 4: 195-215
81. Rosner B., Messner K., Tucker E., Bruce A. 1998. Improved preservative penetration of spruce after pre-treatment with selected fungi. I: fungal pre-treatment of pole sections. International Research Group on Wood Preservation (IRG/WP 98-40117). Stockholm

82. Ruddick J. N. R., Xie C. 1995. Influence of the enhanced nitrogen in ammonical copper treated wood on decay by brown and white fungi. Material und Organismen, 29, 3: 93-104
83. Schmidt C. J., Whitten B. K., Nicholas D. D. 1981. A proposed role of oxalic acid in nonenzymatic wood decay by brown - rot fungi. V: Proceedings American Wood Preservation Association, 77: 157-164
84. SIST EN 335-1. 2006: Trajnost lesa in lesnih materialov – definicija razredov ogroženosti pred biološkim napadom. 1 del: splošno. 16 str.
85. Spletni albumi Picasa. 2008. (13.jan. 2008)  
[http://picasaweb.google.com/lh/photo/nUX\\_Lwwi6wBudHDLQik8g](http://picasaweb.google.com/lh/photo/nUX_Lwwi6wBudHDLQik8g) (6. maj 2010)
86. Starkey R. L. 1973. Effects of pH on toxicity of copper to *Scytalidium* sp., a copper tolerant fungus, and some other fungi. Journal of General Microbiology, 78, 4: 217-225
87. Stephan I., Leithoff H., Peek R. D. 1996. Microbial conversion of wood treated with salt preservatives. Material und Organismen, 30, 4: 179-199
88. Suolahti O., Wallen A. 1958. Der Einfluss der Nasslagerung auf das Wasseraufnahmevermögen des Kiefernsplintholzes. Holz Roh Werkst, 16: 8-17
89. Sutter H. P., Jones E. B. G., Wälchli O. 1983. The mechanism of copper tolerance in *Poria plecata* (Fr.) Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.) Fr.. Material und Organismen, 18, 6: 241-262
90. Takao S. 1965. Organic acid production by basidiomycetes, I. Screening of acid – producing strains. Applied Microbiology, 13, 12: 732-737
91. Tang H., Ruddick J. N. R. 1994. Evaluating the potential of Amine chemicals for use as Wood Protecting Agents. The International Research Group on Wood Preservation, Document IRGA/WP, 94-30049:1-1
92. Tavzes Č. 2003. Preučevanje encimskih in neencimskih procesov razgradnje lesa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 138 str.
93. Tsunoda K., Nagashima K., Takahashi M. 1997. High tolerance of wood – destroying brown-rot fungi to copper based fungicides. Material und Organismen, 31, 1: 31-44
94. Uhelj A. 2006. Vpliv lastnosti vode na izpiranje bakrovih pripravkov iz lesa. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za lesarstvo: 32 str.
95. Vesentini D., Dickinson D. J., Murphy R. J. 2004. Sequestration of copper ions by the extracellular mucilaginous material (ECMM) of two wood rotting basidiomycetes. V: 35th Annual Meeting. Ljubljana Slovenia, IRG/WP 04-10533
96. Vesentini D., Dickinson D.J., Murphy R.J. 2007. (The protective role of the extracellular mucilaginous material (ECMM) from two wood-rotting basidiomycetes against copper toxicity). International Biodeterioration & Biodegradation, 60, 1: 1-7
97. Vidic I. 2008. Razgradnja kloriranih organskih biocidov z lignolitičnimi glivami. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, 104 str.
98. Wainwright M. 1992. An Introduction to Fungal Biotechnology. New York, John Wiley: 202 str.
99. Wikimedia commons. 2007. (10. jun. 2007)  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gloeophyllum\\_trabeum\\_.lindsey.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gloeophyllum_trabeum_.lindsey.jpg) (6. maj 2010)
100. Woodward B., De Groot R. 1999. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolated to copper in agar media. Forest Products Journal, 49, 3: 87-94

101. Zabel R. A. 1954. Variations in preservative tolerance of wood-destroy fungi.  
Forest products journal, 4, 2: 166-169
102. Za naravo. 2006. Kompleti za gojenje bukovih ostrigarjev (*Pleurotus ostreatus*)  
[www.zanaravo.com/kompleti\\_ostrigarji.html](http://www.zanaravo.com/kompleti_ostrigarji.html) (9. junij 2010)
103. Zhang J., Kamden D. P. 2000. Interactions of copper-amine with southern pine.  
Retention and Migration. Wood and Fibre Science, 32, 4:332-339

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Mihu Humarju za pomoč in usmerjanje pri izvajaju eksperimentov in pisanju diplomske naloge.

Hvala tudi prof. dr. Francu Pohlevnu za strokovno recenzijo diplomskega dela in za vse nasvete, ki se jih s pridom uporabila pri pisanju naloge.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim v Delovni skupini za patologijo in zaščito lesa, ki so mi prijazno pomagali pri mojem delu.

Posebej se zahvaljujem tudi svojima staršema, ki sta mi omogočila študij in me podpirala, ko je bilo to najbolj potrebno, ter sošolcem in prijateljem za nepozabna študentska leta.